

ผลของซิงค์ซัลเฟต และคอปเปอร์ซัลเฟตต่อการเจริญ การสร้างสปอร์และการงอกของสปอร์
ของเชื้อราบิวเวอเรีย

Effect of Zinc Sulfate and Copper Sulfate on Mycelial Growth, Spore Production and Spore
Germination of an Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*

วนิดา เพ็ชรลมูล^{1*} พูนสุข ประเสริฐสรพร² อมรรัตน์ ชุมทอง³ และภวิกา บุญยพิพัฒน์³

Wanida Petlamul^{1*}, Poonsuk Prasertsan², Amornrat Chumthong³ and Pawika Boonyapipat³

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของโลหะหนักในกลุ่ม ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) และคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ที่มีต่อการเจริญ การสร้างสปอร์ และการงอกของสปอร์ของเชื้อราบิวเวอเรีย *Beauveria bassiana* ในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการโดยนำสารละลาย ซิงค์ซัลเฟต หรือสารละลาย คอปเปอร์ซัลเฟต ที่ระดับความเข้มข้น 0.025-0.20 โมลาร์ ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °C) เป็นเวลา 15 วัน ผลการทดลอง พบว่า สารละลายซิงค์ซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 0.15-0.2 โมลาร์ และสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตที่ทุกระดับความเข้มข้น สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 100% และการงอกของสปอร์ได้ 98.5-100% นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นดังกล่าวเชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างสปอร์ได้ในช่วง $1.7-5.5 \times 10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร น้อยกว่าชุดควบคุม 8.035×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) อย่างไรก็ตาม สารละลายซิงค์ซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 0.025, 0.05 และ 0.10 โมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้เพียง 39.0-84.8% และการงอกของสปอร์ 67.5-80.5%

คำสำคัญ: เชื้อราบิวเวอเรีย การเจริญของเส้นใย การสร้างสปอร์ การงอกของสปอร์

Abstract

The effect of heavy metals including zinc sulfate ($ZnSO_4$) and copper sulfate ($CuSO_4$) on the mycelial growth, spore production and spore germination of *Beauveria bassiana* was investigated in a laboratory experiment. $ZnSO_4$ or $CuSO_4$ concentrations varied from 0.025 to 0.20 M were added to the PDA medium after its sterilization and then were incubated at room temperature (30 ± 2 °C) for 15 days. The results showed that 0.15 and 0.2 M $ZnSO_4$ and all concentrations of $CuSO_4$ could inhibit fungal growth for 100% and spore germination for 98.5-100%. In addition, in those concentration, the fungal spore production was in the range of $1.7-5.5 \times 10^6$ spores mL^{-1} which was lower than the controlled (8.035×10^8 spores mL^{-1}) significantly ($p < 0.01$). However, 0.025, 0.05 and 0.10 M $ZnSO_4$ could inhibit fungal growth in a range of 39.0 - 84.8% and spore germination around 67.5-80.5%.

Keywords: *Beauveria bassiana*, Mycelial Growth, Spore Production, Spore Germination

¹ อ.ดร., โครงการจัดตั้งมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา วิทยาเขตสตูล มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา สงขลา 90000

² ศ.ดร., ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110

³ อ.ดร., โปรแกรมวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา สงขลา 90000

* Corresponding author: e-mail: wanipet@hotmail.com Tel. 0835146907

บทนำ

แม้ว่าปัจจุบันมีการณรงค์ให้มีการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรแบบปลอดภัย แต่ความจริงแล้วเกษตรกรยังคงใช้สารเคมี ศัตรูพืชและปุ๋ยเคมีทางวิทยาศาสตร์กันอย่างแพร่หลายก่อให้เกิดมลพิษทางดิน ซึ่งสารเคมีประเภทโลหะหนักที่สะสมในดินได้แก่ สารหนู (As) แคดเมียม (Cd) ตะกั่ว (Pb)ปรอท (Hg) สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) ธาตุเหล่านี้สลายตัวในธรรมชาติได้ยาก และสามารถถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่ [1] สำหรับ สังกะสี และทองแดง นับว่าเป็นธาตุอาหารรองที่มีความจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิต แต่ต้องได้รับในปริมาณที่เหมาะสมเพราะความเข้มข้นที่มากเกินไป จะเป็นพิษต่อเซลล์ และกระบวนการ เมทาบอลิซึมของเซลล์ [2-3] สังกะสี และทองแดงยังถูกใช้ผสมในอาหารสุกรเพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต หากสารกลุ่มนี้ตกค้างเกินมาตรฐาน นอกจากจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคเนื้อสุกรแล้ว ยังสะสมในพืชผลทางการเกษตรที่ใช้มูลสุกรเป็นปุ๋ย [4] มลพิษทางดินที่เกิดจากการตกค้างของโลหะหนัก มีผลต่อโครงสร้างดิน การสะสมสารอินทรีย์ในดิน ค่าความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในดินหรือ ค่า water activity (a_w) และอุณหภูมิในดิน [5-6] Gadd [2] รายงานว่าสภาพดินโดยทั่วไปมักพบการตกค้างของสังกะสีมากกว่าทองแดง ขณะที่ทองแดงมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าสังกะสี ในทำนองเดียวกัน Barajas-Aceves และคณะ [7] รายงานว่า ฤทธิ์ของทองแดง ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีค่ามากกว่าสังกะสีถึง 100 เท่า นอกจากนี้ความเข้มข้นของสังกะสี และทองแดงยังมีผลต่อปริมาณและความหลากหลายของเชื้อราในดิน [8] รวมถึงความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนในวัฏจักรคาร์บอน ซึ่งถือเป็นดัชนีสำคัญในการชี้วัดคุณภาพของดิน [9] ตัวอย่างเชื้อราที่มีประโยชน์ และอาศัยเศษอินทรีย์สารในการเจริญเติบโตมีหลายชนิด ได้แก่ *Metarhizium anisopliae* *Paecilomyces* sp. *Verticillium* sp. และ *Beauveria bassiana* [10-11] โดยเฉพาะเชื้อรา *B. bassiana* ซึ่งเป็นหนึ่งในกลุ่มเชื้อราแมลงที่มีประสิทธิภาพในการทำลายแมลงได้หลายชนิด มีปริมาณ และความหลากหลายในดินมากถึง 90% ที่สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดคุณภาพดินที่เหมาะสมต่อการเจริญของกลุ่มเชื้อราแมลง [12] นอกจากนี้ เชื้อรา *B. bassiana* ยังได้รับการส่งเสริมให้ใช้ในการควบคุมแมลงแบบชีววิธีเพื่อลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรอันเป็นการส่งเสริมเกษตรอินทรีย์ตามแผนเศรษฐกิจของประเทศ

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของไอออนสังกะสี และไอออนทองแดง ที่มีต่อการเจริญ และการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ในห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาผลกระทบของการตกค้างของโลหะหนักในดินที่มีต่อจำนวน และความหลากหลายของเชื้อราแมลงในระบบนิเวศเกษตรต่อไป

วิธีการวิจัย

เชื้อรา *Beauveria bassiana* และการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

คัดเลือกเชื้อราในห้องปฏิบัติการและพบว่า เชื้อรา *B. bassiana* BNBCRC มีประสิทธิภาพในการทำลายหนอนกระทู้ผัก (cutworm, *Spodoptera litura*) สูงสุด (80%) และมีการออกของสปอร์สูงสุด (72.22 %) [13] โดยเลี้ยงเชื้อรานิดนี้บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น [14-15] เก็บรักษาหัวเชื้อเริ่มต้นใน slant PDA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ และมีการถ่ายเชื้อใหม่ทุกเดือน

การศึกษาผลของ $ZnSO_4$ และ $CuSO_4$ ต่อการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* BNBCRC

นำเชื้อรา *B. bassiana* BNBCRC ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน เจาะบริเวณปลายเส้นใยด้วย cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร [16] สำหรับอาหารทดสอบเตรียมได้จากอาหาร PDA ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วมาผสมกับสารละลายซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) และสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ที่ความเข้มข้น 0.025 0.05 0.10 0.15 และ 0.2 โมลาร์ โดยใช้เครื่องผสม (vortex mixer) จากนั้น

ดูอาหารทดสอบที่ผสมสารแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plates) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร รองจนกระทั่งอาหารแข็งตัว เมื่อผิวหน้าอาหารแห้งแล้ว นำชิ้นวุ้นที่เจาะไว้วางคว่ำด้านที่มีเส้นใยบนอาหารทดสอบ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส (ทำการทดลอง ชุดซ้ำกัน 3 ชุด ชุดละ 5 plates) หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 3 วัน ตรวจวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุก ๆ 2 วัน คือ วันที่ 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 และเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อาหาร PDA ที่ไม่เติมสารละลายซิงค์ซัลเฟต และสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต) เพื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารทดสอบต่อการเจริญของเส้นใยโดยใช้สูตร [17] ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ/การงอกของสปอร์} = \frac{(x - y) * 100}{x} \quad (1)$$

x คือ ค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่มีการเจริญ/การงอกบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดควบคุม

y คือ ค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่มีการเจริญ/การงอกบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดทดสอบ

หลังจากทดสอบการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละชุดการทดลองแล้วเป็นเวลา 15 วัน ศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของสปอร์โดยใช้ 0.05% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารที่เลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมที่ลนไฟชุบบริเวณผิวจุด spore suspension ที่เก็บเกี่ยวได้ไปหาความเข้มข้นของสปอร์ด้วย haemocytometer [18]

การศึกษาผลของ ZnSO_4 และ CuSO_4 ต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* BNBCRC

ดู spore suspension ที่มีค่าความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มา 0.1 มิลลิลิตรหยดลงบนผิวหน้าอาหารในแต่ละชุดการทดลอง เกลี่ย spore suspension ให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยมที่ลนไฟ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตัดชิ้นวุ้นขนาด 1×1 เซนติเมตร วางบนกระจกสไลด์ โดยหยางด้านที่มีสปอร์ขึ้น หยด lactophenol cotton blue ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปิดทับด้วย cover slip นับจำนวนสปอร์ที่งอก โดยพิจารณาจากความยาวของ germ tube ต้องยาวมากกว่าขนาดของสปอร์จึงถือว่างอก นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกโดยใช้สูตรตามสมการ (1) จากนั้นนำผลเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราที่ได้จากคำนวณตามสมการที่ 1 ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราในแต่ละชุดการทดลองต่อไป

ผลการวิจัย

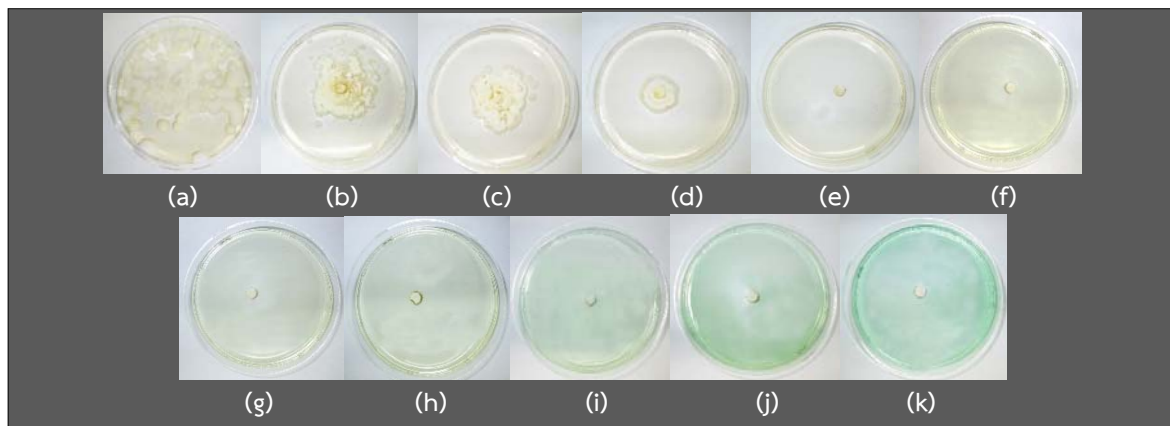
ผลของ ZnSO_4 และ CuSO_4 ต่อการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* BNBCRC

การทดลองเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* BNBCRC ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส บนอาหาร PDA ที่ผสม ZnSO_4 และ CuSO_4 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.025 - 0.20 โมลาร์ พบว่า การเจริญของเชื้อราชนิดนี้ในทุกชุดการทดลองน้อยกว่า ชุดควบคุม (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) โดยเชื้อรา *B. bassiana* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสม ZnSO_4 ที่ระดับความเข้มข้น 0.15-0.20 โมลาร์ และ CuSO_4 ในทุกระดับความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิดนี้ได้สมบูรณ์ถึง 100% ขณะที่ ZnSO_4 ที่ระดับความเข้มข้น 0.025-0.10 โมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญได้สมบูรณ์เฉพาะในวันที่ 3 ของการทดลอง และความสามารถในการยับยั้งลดลง (39.0-84.8%) หลังจากทำการทดลองในระยะ 5-15 วัน (ตารางที่ 1) สำหรับผลการเจริญของเชื้อราชนิดนี้หลังจากเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารทดสอบเป็นระยะเวลา 15 วัน แสดงได้ดังภาพที่ 1

ตารางที่ 1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารละลาย ZnSO₄ และ CuSO₄ ที่ระดับความเข้มข้น 0.025 0.05 0.10 0.15 และ 0.2 โมลาร์ บ่มในสภาวะอุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส

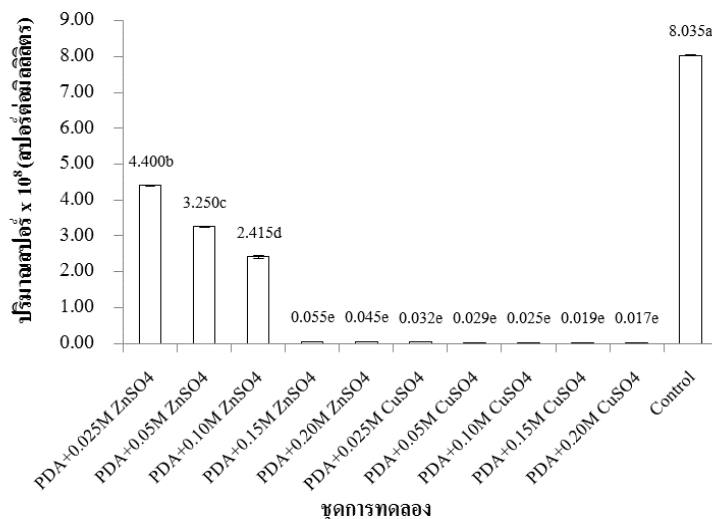
ชุดการทดลอง	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Beauveria bassiana</i> (%)							
	0*	3	5	7	9	11	13	15
PDA+0.025M ZnSO ₄	0.0±0.00	100.0±0.01 ^a	56.8±0.03 ^d	55.9±0.03 ^d	54.7±0.03 ^d	51.2±0.02 ^d	42.4±0.04 ^d	39.0±0.04 ^d
PDA+0.05M ZnSO ₄	0.0±0.00	100.0±0.00 ^a	78.6±0.02 ^c	69.0±0.02 ^c	68.0±0.02 ^c	64.6±0.02 ^c	63.4±0.03 ^c	63.1±0.03 ^c
PDA+0.10M ZnSO ₄	0.0±0.00	100.0±0.00 ^a	84.8±0.02 ^b	80.5±0.02 ^b	74.7±0.01 ^b	72.2±0.02 ^b	71.9±0.02 ^b	70.2±0.04 ^b
PDA+0.15M ZnSO ₄	0.0±0.00	100.0±0.001 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a
PDA+0.20M ZnSO ₄	0.0±0.00	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a
PDA+0.025M CuSO ₄	0.0±0.00	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a
PDA+0.05M CuSO ₄	0.0±0.00	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a
PDA+0.10M CuSO ₄	0.0±0.00	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a
PDA+0.15M CuSO ₄	0.0±0.00	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a
PDA+0.20M CuSO ₄	0.0±0.00	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a	100.0±0.00 ^a
Control (PDA without ZnSO ₄ and CuSO ₄ addition)	0.0±0.00	0.0±0.00 ^b	0.0±0.00 ^e	0.0±0.00 ^e	0.0±0.00 ^e	0.0±0.00 ^e	0.0±0.00 ^e	0.0±0.00 ^e
F-test	ns	**	**	**	**	**	**	**

* วันที่ทำการทดลอง ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$, ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



ภาพที่ 1 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* บนอาหาร PDA ที่บ่มในสภาวะอุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน โดยการเจริญทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (a), PDA+0.025M ZnSO₄ (b), PDA+0.05M ZnSO₄ (c), PDA+0.10M ZnSO₄ (d), PDA+0.15M ZnSO₄ (e), PDA+0.20M ZnSO₄ (f), PDA+0.025M CuSO₄ (g), PDA+0.05M CuSO₄ (h), PDA+0.10M CuSO₄ (i), PDA+0.15M CuSO₄ (j), PDA+0.20M CuSO₄ (k)

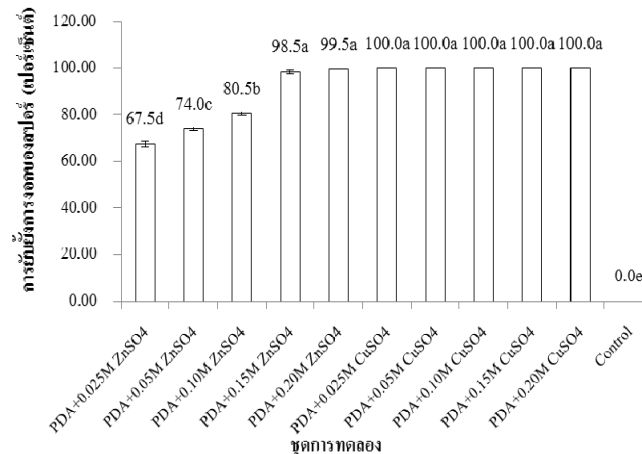
เมื่อศึกษาปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมด้วยสารละลาย ZnSO_4 และ CuSO_4 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.025 0.05 0.10 0.15 และ 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 15 วัน พบว่า ปริมาณความเข้มข้นของสปอร์ในทุกชุดการทดลองมีค่าน้อยกว่าชุดควบคุม (8.035×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) สำหรับเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมด้วยสารละลาย ZnSO_4 0.025 โมลาร์ พบปริมาณสปอร์สูงสุดเท่ากับ 4.39×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 2) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) กับปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมด้วยสารละลาย ZnSO_4 0.05 0.10 0.15 และ 0.2 โมลาร์ และสารละลาย CuSO_4 ในทุกความเข้มข้น ขณะที่เชื้อราชนิดนี้ผลิตสปอร์ได้ในปริมาณต่ำสุด (1.7×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมด้วยสารละลาย CuSO_4 0.20 โมลาร์



ภาพที่ 2 ปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารละลาย ZnSO_4 และ CuSO_4 ที่ระดับความเข้มข้น 0.025 0.05 0.10 0.15 และ 0.2 โมลาร์ บ่มในสภาวะอุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

ผลของ ZnSO_4 และ CuSO_4 ต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* BNBCRC

จากการศึกษาการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารละลาย ZnSO_4 และ CuSO_4 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.025 0.05 0.10 0.15 และ 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า การใช้สารละลาย CuSO_4 ยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100% ขณะที่สารละลาย ZnSO_4 ยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 67.5-99.5% (ภาพที่ 3) ซึ่งผลการยับยั้งการงอกของสปอร์มีค่าสูงกว่าชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)



ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* บนอาหาร PDA ที่ผสมสารละลาย ZnSO₄ และ CuSO₄ ที่ระดับความเข้มข้น 0.025 0.05 0.10 0.15 และ 0.2 โมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่า สารละลาย CuSO₄ ยับยั้งการเจริญ การสร้างสปอร์ และการงอกของสปอร์มากกว่าสารละลาย ZnSO₄ หรืออาจกล่าวได้ว่า เชื้อรา *B. bassiana* สามารถทนต่อสภาวะที่มีโลหะหนักในกลุ่ม สารละลาย CuSO₄ ได้น้อยกว่า สารละลาย ZnSO₄ [19] หรือสารละลาย CuSO₄ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า สารละลาย ZnSO₄ จึงส่งผลให้เชื้อราเจริญและสร้างสปอร์ได้น้อยกว่า [7-8] นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารละลายที่มากขึ้นมีผลต่อการยับยั้งการเจริญ การสร้างสปอร์ และการงอกของสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้ จากการทดสอบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารละลาย CuCl₂ 0.4 M พบว่า เชื้อราทั้งสองชนิดถูกยับยั้งการเจริญได้อย่างสมบูรณ์ [20] ในทำนองเดียวกันเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *Paecilomyces fumosoroseus* ถูกยับยั้งการเจริญได้อย่างสมบูรณ์เมื่อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารละลาย ZnCl₂ 0.3 M และ CuCl₂ 0.2 M [21] ขณะที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารละลาย ZnCl₂ 0.03 M และ CuCl₂ 0.02 M พบการเจริญได้มากขึ้นเท่ากับ 31.1 และ 14 มิลลิเมตร ตามลำดับ [22] และสารประกอบโลหะหนักในกลุ่มนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราแมลงชนิดอื่นได้อีก คือ *Verticillium lecanii* [23] จะเห็นได้ว่า เชื้อราหลายชนิดถูกยับยั้งการเจริญด้วยสารประกอบโลหะหนัก เนื่องจากสารกลุ่มนี้จะไปจับกับโปรตีนและเอนไซม์ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ ส่งผลเสียต่อการเจริญ และการเพิ่มปริมาณเซลล์ต่อไป อย่างไรก็ตาม สารละลายสังกะสี เคยมีรายงานว่า สามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อรา [24] แสดงให้เห็นว่า ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อรามีผลต่อความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีสารประกอบโลหะหนักตกค้าง

สรุปผลการวิจัย

สารเคมีเกษตรโดยส่วนใหญ่จะมีองค์ประกอบของโลหะหนัก ซึ่งการใช้ในปริมาณมาก ๆ นอกจากจะส่งผลกระทบต่อเกษตรกร และผู้บริโภคแล้ว จะก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างในดินที่ส่งผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตในดิน ดังเช่น กรณีศึกษาของเชื้อรา *B. bassiana* เชื้อราแมลงที่มีประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืชแบบชีววิธี ที่เจริญในดิน โดยจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า สารละลายทองแดงที่ระดับความเข้มข้น 0.025 - 0.2 โมลาร์ ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิดนี้ได้มากกว่าสารละลายสังกะสี นอกจากสารทั้งสองชนิดนี้จะมีผลต่อการเจริญของ

เส้นใยเชื้อราแล้ว ยังมีผลต่อการสร้างสปอร์ และการงอกของสปอร์ และเป็นไปได้ว่า งานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาประเมินปริมาณและความหลากหลายของเชื้อราแมลงที่มีประโยชน์อีกหลายชนิดได้ต่อไป ตลอดจนใช้ในการวิเคราะห์หรือตัวชี้วัดคุณภาพดินได้อีกทางหนึ่ง

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัยของสำนักงานกองทุนวิจัยสนับสนุนการวิจัย (RTA5780002) และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือสำหรับการวิจัย จากมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ร่วมกับภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

- [1] ปภามณูญ์ ชีประเสริฐ พัฒนา อนุรักษ์พงษ์ธร และสิรินาฏ เลหาโรจนพันธ์. (2554). “การดูดซับและการปลดปล่อยแคดเมียมในดินนาข้าว”, ใน การประชุมวิชาการการเสนอผลงานระดับบัณฑิตศึกษาครั้งที่ 12 ประจำปี 2554, วันที่ 28 มกราคม 2554 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- [2] Gadd, G. M. (1993). “Interaction of fungi with toxic metals”, *New Phytol.* 124, 25-60.
- [3] Aelion, C. M., Davis, H. T., McDermott, S. and Lawson, A. B. (2009). “Soil metal concentrations and toxicity: associations with distances to industrial facilities and implications for human health”, *Sci. Total. Environ.* 407, 2216-2223.
- [4] พิษณุ ตุลยกุล. (2552). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับโลหะหนัก (zinc และ copper) และ ปริมาณของเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella spp.* ในน้ำเสียและดินที่ได้จากฟาร์มสุกร. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สนับสนุนโดยสำนักงานการวิจัย กรุงเทพมหานคร.
- [5] Zak D. R., Holmes W. E., White D. C., Reacock A. D. and Tilman, D. (2003). “Plant diversity and microbial communities”, *Ecol.* 84, 2042-2050.
- [6] Grishkan, I. and Nevo, E. (2010). Spatiotemporal distribution of soil microfungi in the Makhtesh Roman area, central Negev desert, Israel. *Fung. Ecol.* 3, 326-337.
- [7] Barajas-Aceves, M., Grace, C., Ansorena, J., Dendooven, L. and Brookes, P. C. (1999). “Soil microbial biomass and organic C in a gradient of Zinc concentrations in soils around a mine spoil tip”, *Soil. Biol. Biochem.* 31, 867-876.
- [8] Hackl, E., Pfeffer, M., Donat, C., Bachmann, G. and Zechmeister-Boltenstern, S. (2005). “Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest”, *Soil. Biol. Biochem.* 37, 661-671.
- [9] Khan, M. and Scullion, J. (2002). “Effects of metal (Cd, Cu, Ni, Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil micro-organisms and their activities”, *Appl. Soil. Ecol.* 20, 145-155.
- [10] Keller S. and Zimmermann G. (1989). Mycopathogens of soil insects. In: Wilding N., Collins N. M., Hammond P. M., Webber J. F. (eds.). *Insect-fungus interactions*. London : **Academic Press**, 240-270. London.

- [11] Klingen I. and Haukeland S. (2006). The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In: Eilenberg J., Hokkanen H. M. T. (eds.). An ecological and societal approach to biological control. **Series: Progress in biological control**, 145-211. Netherlands: Springer.
- [12] Pečiulytė, D and Dirginčiūtė-Volodkienė, V. (2012). "Effect of zinc and copper on cultivable populations of soil fungi with special reference to entomopathogenic fungi", **EKOL.** 58, 65-85.
- [13] Petlamul, W. and Prasertsan, P. (2012). "Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, spores production, radial growth and enzyme activity", **Mycobiol.** 40, 111-116.
- [14] Soundarapandian, P. and Chandra, R. (2007). "Mass production of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota; Hyphomycetes) in the laboratory", **Res. J. Micro.** 2, 690-695.
- [15] Pham, T. A., Kim, J. J., Kim, S. G. and Kim, K. (2009). "Production of spore of entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a submerged batch culture", **Mycobiol.** 37, 218-224.
- [16] Thaochan, N. and Chinajariyawong, A. (2008). "Spore germination and mycelia growth of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin effected by different temperature regimes", **Agri. Sci. J.** 39, 21-25.
- [17] Kassa, A., Brownbridge, M., Pakker, B. L., Skinner, M., Gouli, V., Gouli, S., Guo, M., Lee, F. and Hata, T. (2008). "Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*", **Mycol. Res.** 112, 583-591.
- [18] Dantigny, P., Bensoussan, M., Vasseur, V., Lebrihi, A., Buchet, C., Ismaili-Alaoui, M., Devlieghere, F. and Roussos, S. (2006). "Standardisation of methods for assessing mould germination: A workshop report", **Int. J. Food. Micro.** 108, 286-291.
- [19] Rajapaksha, R. M. C. P., Tobor-Kaplon, M. A. and Băăth, E. (2004). "Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently", **Appl. Environ. Micro.** 62, 4420-428.
- [20] Tkaczuk, C., Mietkiewski, R. and Krolak, E. (1998). "The effect of metal ions on the growth of selected entomopathogenic fungi", **IOBC WPRS Beull.** 21-45.
- [21] Tkaczuk, C. (2003). "Effect of selected metal ions on the growth and germination of entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (wize) brown et smith", **Chem. Inz. Ekol.** 10(3-4), 323.
- [22] Tkaczuk, C. (2005). "The effect of selected heavy metal ions on the growth and conidial germination of the aphid pathogenic fungus *Pandora neoaphidis*", **Pol. J. Environ. Stud.** 14, 897-902.
- [23] Robek, D. and Para, A. (2002). "The effect of heavy metal ions and their complexions upon the growth, sporulation and pathogenicity of *Verticillium lecanii*", **J. Invert. Pathol.** 79, 124.
- [24] Bajan, C., Tyrawska, D., Popowska-Nowak, E. and Bienkowski, P. (1998). "Biological response of *Beauveria bassiana* strains to heavy metal pollution and their accumulative ability", **Chem. Inz. Ekol.** 5(8-9), 685.