Thesis Title Evaluation of the Appropriate Bait for Adult Blow Fly, *Chrysomya megacephala*, Using the New Model of Wind Tunnel and Field Study

Author Mr. Kittikhun Moophayak

Degree Doctor of Philosophy (Parasitology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Kabkaew L. Sukontason	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Kom Sukontason	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Orawon Chailapakul	Co-advisor

ABSTRACT

Olfactory cue, produced from insect-preferred feeding or oviposition resource, plays an important role in the attraction of various insects. Using a trap with effective olfactory-related bait has been documented as a high potential strategy for controlling several insect populations, including the blow fly. This study was designed to develop effective olfactory-related baits and analyze the main attractive components from animal-origin products to lure *Chrysomya megacephala*, a medically important blow fly in many parts of the world including Thailand.

This study presented the I-box wind tunnel, which consists of seven conjoined compartments. Five of them are formed in linear apparatus within a clear glass tunnel (30×30×190 cm); i.e., one central “release compartment” where flies are introduced to the tunnel, two glass “trap compartments” where flies are attracted and allowed to reside, and two glass “stimulant compartments” where baits are placed. Two

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

wooden “fan compartments” are situated one at each end of the apparatus and equipped with adjustable fans for wind sources, removable daylight fluorescent lamps as horizontal-light sources, and a filter sheet to filtrate air before it passes into the center of the tunnel.

Wind tunnel experiments were carried out in a temperature-controlled room, with a room-light as a vertical-light source and a room-ventilated fan for removing odor out of the tunnel. Evaluation of testing parameters revealed that using 60 flies for a 1-hour test period between 1 p.m. and 5 p.m., under wind speed of 0.58 m/s, vertical-room light intensity of 341.33 lux and horizontal-tunnel light intensity of 135.93 lux, created an ideal combination of variables for observing behavioral responses of *C. megacephala* in the wind tunnel.

Eight kinds of animal-origin products, i.e., beef liver, beef scrap, pork heart, pork intestine, pork liver, pork muscle, pork scrap and whole-body chub mackerel, were categorized into fresh, 1-day tainted and 3-day tainted baits, and tested against 5-10 day-old, virgin, and well-fed *C. megacephala* using I-box wind tunnel under the condition described above. The results demonstrated that 1-day tainted pork scrap yielded the highest attractive index (A.I.) of 0.59, which was contrary to all categories of chub mackerel that had an A.I. ranging from -0.01 to 0.02.

Three extractions (4-hour absorption, 4-hour pumping and 24-hour maceration) manipulated with 7 solvents (50% and 70% ethanol, distilled water, glycerol, paraffin oil, polyethylene glycol and soybean oil) were employed to produce attractant-extracted solutions (2:1 *w*/*v*) from 1-day tainted pork scrap. The wind tunnel investigations revealed that the *C. megacephala* response to 15 extracted solutions was varied, with A.I. ranging from -0.11 to 0.55. Of these, the attractant-macerated

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

water (AmDW) yielded the highest attraction; while, the solutions prepared with 50% and 70% ethanol obtained low attractions limited to an A.I. of only 0.13. Changing the conditions of AmDW preparation by reducing the concentration to 1:1 and 1:2 *w*/*v*, pre-washing pork scrap with boiling water and ethanol, limiting aeration, and adding salt, acid and base reduced the attractive potency to flies. AmDW solution of 5 mL held high attraction for 1 hour when tested against this fly species within a rearing cage. When compared among the A.I. of different laboratory strain fly species, *C. megacephala* achieved the highest response to AmDW solution in the wind tunnel over *Lucilia cuprina*, *Achoetandrus rufifacies*, *Musca domestica* and *Parasarcophaga dux*, respectively. Comparative field assessments using traps with baits support wind tunnel investigations, in that wild *C. megacephala* was the most collected species (55.0%), and traps baited with AmDW solution obtained the highest percentage (61.9%) of this fly species, followed by those baited with 1-day tainted pork scrap (56.4%), 1-day tainted beef scrap (49.2%) and 1-day tainted chub mackerel (48.8%). Overall, 76.9% of *C. megacephala* trapped were females and more than 87.5% of them were non-gravid. Accordingly, AmDW solution can be used effectively as attractant for the future control of *C. megacephala* populations.

The use of 1-day tainted pork scrap and beef scrap attracted other medically important flies in the field study, such as *Hypopygyopsis tumrasvini* (Diptera: Calliphoridae) and *Atherigona* spp. (Muscidae). Investigation of the larval and adult morphology of these species also was performed using a light microscope. Such information provided valuable information, which will be useful for applying to future forensic cases in Thailand.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Analyses using HS-GC-MS and HS-SPME-GC-MS revealed that ammonia, butanoic acid, carbon dioxide, dimethyl disulfide, dimethyl tetrasulfide, dimethyl trisulfide, elemental sulfur, ethanoic acid and indole were the common volatile compounds emitted from the highly attractive bait of 1-day tainted pork scrap and AmDW solution. In addition to the volatile profile of AmDW solution, such additional compounds as propanoic acid, methyl propanoic acid, 2-methyl butanoic acid, methyl pentanoic acid, ethanol and nonanal were detected as well. On the contrary, the volatile profile of 1-day tainted chub mackerel comprised mainly carbon dioxide and small amounts of hexanal, trimethyl benzene, pentadecene, tetramethyl pentadecane and methyl cyclohexene. Hence, the attractive ingredients for luring *C. megacephala* could be a complex of ammonia, sulfur compounds (dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, dimethyl tetrasulfide and elemental sulfur), short-chain acids (butanoic acid, ethanoic acid, methyl pentanoic acid and pentanoic acid), and indole. Of these, commercial chemical solutions of ammonia, 2-butanone, ethanol, dimethyl disulfide and 2-heptanone were tested against *C. megacephala* for 5 min within the rearing cage and 1 hour inside the wind tunnel by formulating in 41 kinds of chemical-based baits, and consequently their attractions yielded relatively low potency. Only ammonia, ethanol, 1% aqueous dilution of dimethyl disulfide and a volatile mixture of ammonia/dimethyl disulfide/ethanol produced moderate attractiveness to *C. megacephala*.

Also, this study showed the influence of physiological conditions on behavioral responses of *C. megacephala* to olfactory-related bait. The response of this fly to bait was not influenced by mating status, since the responses between virgin and mated flies were comparable when examined in the wind tunnel experiments.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

However, when flies get older (5-10 day-old→15-20 day-old→30-35 day-old), the responsiveness of virgin flies to AmDW solution gradually decreased (A.I. = 0.59→0.52→0.40, respectively). As for climatic effects, behavioral response of *C. megacephala* to bait was observed for 5 min by using a rearing cage test placed in different climatic conditions of sunshade, indoors and outdoors. The results revealed that more *C. megacephala* flies responded to AmDW solution positioned at high light intensity and exposure than to medium and low conditions in sunshade. A large number of responding flies to bait was found when setting the cage in high temperature and low relative humidity, indoors and outdoors, suggesting that attraction of AmDW solution to *C. megacephala* positively correlated to temperature, light intensity and exposure, but negatively to relative humidity.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การประเมินผลเหยื่อล่อที่เหมาะสมสำหรับตัวเต็มวัยแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* โดยใช้อุโมงค์ลมแบบใหม่ และการศึกษาภาคสนาม

ผู้เขียน นายกิตติคุณ หมู่พยัคฆ์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ปรสิตวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. กาบแก้ว สุคนธสรรพ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ.ดร.นพ. คม สุคนธสรรพ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ.ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

สารชี้นำทางการดมกลิ่น (olfactory cue) ที่ถูกปล่อยออกจากแหล่งอาหารหรือแหล่งวางไข่ของแมลง มีบทบาทสำคัญในการดึงดูดแมลงต่างๆ การใช้กรงดักร่วมกับเหยื่อล่อทางการดมกลิ่นที่มีประสิทธิภาพ เป็นวิธีหนึ่งที่มีศักยภาพในการควบคุมประชากรของแมลงหลายชนิด รวมถึงแมลงวันหัวเขียว การศึกษานี้จึงออกแบบเพื่อพัฒนาเหยื่อล่อทางการดมกลิ่นที่มีประสิทธิภาพร่วมกับวิเคราะห์หาสารดึงดูดหลักจากผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เพื่อใช้ในการดักจับแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* ซึ่งมีความสำคัญทางการแพทย์ในหลายพื้นที่ทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย

การศึกษานี้ได้ออกแบบและสร้างอุโมงค์ลมในรูปแบบ I-box ซึ่งประกอบด้วย 7 ส่วนประกอบ โดยมี 5 ส่วนประกอบตรงกลางทำจากกระจกใส เรียงตัวในแนวเส้นตรง (30×30×190 เซนติเมตร) ได้แก่ ส่วนปล่อยแมลง จำนวน 1 อัน สำหรับเป็นช่องทางปล่อยแมลงวันเข้าอุโมงค์ลม ส่วนดักจับ จำนวน 2 อัน สำหรับเก็บแมลงวันตัวที่ตอบสนองเหยื่อหรือเกาะพักภายใน และส่วนสิ่งเร้า จำนวน 2 อัน สำหรับเป็นที่วางเหยื่อล่อ และส่วนที่เหลือ จำนวน 2 อัน ทำจากไม้ วางประกบที่ปลายสุดในแต่ละด้านของอุโมงค์ลม เรียกว่า ส่วนพัดลม ซึ่งแต่ละอันของส่วนประกอบส่วนนี้ถูกติดตั้งด้วยพัดลมที่สามารถปรับความเร็วได้ เพื่อใช้เป็นแหล่งกำเนิดลม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลอดไฟเพื่อใช้เป็นแหล่งกำเนิดไฟในแนวระนาบ และแผ่นกรองอากาศเพื่อกรองอากาศก่อนที่จะเข้าไปภายในอุโมงค์ การทดสอบด้วยอุโมงค์ลมถูกทดลองภายในห้องควบคุมอุณหภูมิ โดยมีแสงไฟจากเพดานห้องสำหรับเป็นแหล่งกำเนิดไฟในแนวดิ่ง และพัดลมดูดอากาศสำหรับเป็นตัวดูดกลิ่นออกจากอุโมงค์ จากการประเมินผลของพารามิเตอร์ต่างๆ พบว่า การใช้แมลงวันจำนวน 60 ตัว ทดสอบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ภายในช่วงเวลา 13.00-17.00 น. ภายใต้ความเร็วลม 0.58 เมตรต่อวินาที ความเข้มแสงในแนวดิ่ง 341.33 ลักซ์ และความเข้มแสงในแนวระนาบ 139.33 ลักซ์ ถือเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสังเกตพฤติกรรมการตอบสนองของ *C. megacephala* ภายในอุโมงค์ลม

ผลการทดสอบภายในอุโมงค์ลมของผลิตภัณฑ์จากสัตว์ จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ ตับวัว เครื่องในผสมเนื้อวัว หัวใจหมู ไส้หมู ตับหมู เนื้อหมู เครื่องในผสมเนื้อหมู และปลาทูทั้งตัว ที่เตรียมในลักษณะเหยื่อสด เหยื่อเน่า 1 วัน และเหยื่อเน่า 3 วัน ต่อการตอบสนองของแมลงวันหัวเขียวอายุ 5-10 วัน ที่ยังไม่ได้รับการผสมพันธุ์แต่ได้รับอาหารเป็นอย่างดี ดังสภาวะข้างต้น แสดงให้เห็นว่าเครื่องในผสมเนื้อหมูเน่า 1 วัน ให้ค่าดัชนีบ่งชี้การดึงดูดสูงที่สุด คือ 0.59 ในทางตรงกันข้ามกับเหยื่อปลาทูเตรียมสด เน่า 1 วัน และเน่า 3 วัน ที่ให้ค่าดัชนีบ่งชี้การดึงดูดอยู่ระหว่าง -0.01 ถึง 0.02

การศึกษาภายในอุโมงค์ลมของสารดึงดูดสกัดจากเครื่องในผสมเนื้อหมูเน่า 1 วัน (ความเข้มข้น 2 ต่อ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ถูกเตรียมโดยอาศัยวิธีการสกัด 3 วิธี (การดูดซับ 4 ชั่วโมง การปั๊ม 4 ชั่วโมง และการหมักแช่ 24 ชั่วโมง) และตัวทำละลาย 7 ชนิด (เอทานอล ร้อยละ 50 และ 70 น้ำกลั่น กลีเซอรอล น้ำมันพาราฟิน โพลีเอทีลีนไกลคอล และน้ำมันถั่วเหลือง) พบว่า *C. megacephala* ตอบสนองต่อสารดึงดูดสกัดทั้ง 15 ชนิด แตกต่างกันไป โดยมีค่าดัชนีบ่งชี้การดึงดูดอยู่ระหว่าง -0.11 ถึง 0.55 ภายในกลุ่มสารสกัดเหล่านี้ สารดึงดูดสกัดด้วยการหมักแช่ในน้ำ (AmDW) ให้ผลการดึงดูดสูงที่สุด ในขณะที่สารดึงดูดสกัดเตรียมในเอทานอลร้อยละ 50 และ 70 ให้ผลการดึงดูดที่ต่ำโดยมีค่าดัชนีบ่งชี้การดึงดูดน้อยกว่า 0.13 การเปลี่ยนแปลงสภาวะการเตรียมสารดึงดูดสกัดของ AmDW โดยการลดความเข้มข้นลงเป็น 1 ต่อ 1 และ 1 ต่อ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร การล้างเครื่องในผสมเนื้อหมูก่อนด้วยน้ำร้อนและเอทานอล การจำกัดการถ่ายเทอากาศ และการเติมเกลือ กรดและด่าง ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการดึงดูดแมลงวันของ AmDW ลดน้อยลง การดึงดูดของ AmDW ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สามารถดึงดูดแมลงวันชนิดนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพนานเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากการทดสอบภายในกรงเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีบ่งชี้การดึงดูดกับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แมลงวันเลี้ยงในห้องปฏิบัติการชนิดอื่นๆ โดยอาศัยอุโมงค์ลม พบว่าการตอบสนองของ *C. megacephala* ต่อ AmDW มีค่าสูงที่สุด สูงกว่าการตอบสนองของแมลงวันหัวเขียว *Lucilia cuprina* และ *Achoetandrus rufifacies* แมลงวันบ้าน (*Musca domestica*) และแมลงวันหลังลาย *Parasarcophaga dux* ตามลำดับ ผลการประเมินการเปรียบเทียบชนิดของเหยื่อล่อร่วมกับกรงดักในภาคสนามสนับสนุนผลการศึกษาในอุโมงค์ลม ที่พบว่า *C. megacephala* ในธรรมชาติ เป็นแมลงชนิดที่ถูกดักจับได้มากที่สุด (ร้อยละ 55.0) และการใช้กรงดักร่วมกับเหยื่อ AmDW สามารถดักจับแมลงวันชนิดนี้ได้มากที่สุด (ร้อยละ 61.9) รองลงมาคือ กรงดักร่วมกับเครื่องในผสมเนื้อหมูเน่า 1 วัน (ร้อยละ 56.4) กรงดักร่วมกับเครื่องในผสมเนื้อวัวเน่า 1 วัน (ร้อยละ 49.2) และกรงดักร่วมกับปลาทูเน่า 1 วัน (ร้อยละ 48.8) ในแมลงวัน *C. megacephala* ที่เก็บได้ทั้งหมด พบว่าเป็นเพศเมีย ร้อยละ 76.9 และมากกว่าร้อยละ 87.5 เป็นแมลงวันที่ยังไม่พร้อมวางไข่ จากที่กล่าวมา สารดึงดูดสกัดชนิด AmDW สามารถใช้เป็นเหยื่อล่อที่มีประสิทธิภาพสำหรับการควบคุมประชากรของ *C. megacephala* ในอนาคตได้

การใช้เหยื่อเครื่องในผสมเนื้อหมูเน่า 1 วันและเครื่องในผสมเนื้อวัวเน่า 1 วันในการทดลองภาคสนาม สามารถดักจับแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ชนิดอื่นๆ ได้แก่แมลงวันหัวเขียว *Hypopygiopsis tumrasvini* และแมลงวัน *Atherigona* spp. (Muscidae) การศึกษาสัณฐานวิทยาในระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของแมลงวันชนิดดังกล่าว จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับการประยุกต์ในกรณีนิติเวชศาสตร์ของประเทศไทยต่อไป

ผลการวิเคราะห์อาศัยเทคนิค HS-GC-MS และ HS-SPME-GC-MS ระบุว่า แอมโมเนีย กรดบิวทาโนอิก คาร์บอนไดออกไซด์ ไดเมทิลไดซัลไฟด์ ไดเมทิลเตตระซัลไฟด์ ไดเมทิลไตรซัลไฟด์ ธาตุซัลเฟอร์ กรดเอทาโนอิก และอินโดล เป็นสารประกอบระเหยสามัญที่ปล่อยออกจากเหยื่อที่มีความสามารถในการดึงดูดที่สูง ดังเช่น เครื่องในผสมเนื้อหมูเน่า 1 วัน และ AmDW สำหรับองค์ประกอบทางเคมีของ AmDW พบว่ายังประกอบด้วยสารเคมีอื่น ได้แก่ กรดโพรพาโนอิก กรดเมทิลโพรพาโนอิก กรด 2-เมทิลบิวทาโนอิก กรดเมทิลเพนทาโนอิก เอทานอล และโนนานาล ในทางตรงข้ามองค์ประกอบสารระเหยของปลาทูที่เน่า 1 วัน ประกอบด้วยองค์ประกอบหลักคือ คาร์บอนไดออกไซด์ ร่วมกับสารประกอบอื่นๆ ในปริมาณน้อย ได้แก่ เฮกซานาล ไตรเมทิลเบนซีน เพนทาดีซีน เตตระเมทิลเพนทาดีเคน และเมทิลไซโคลเฮกซีน ด้วยเหตุนี้สารประกอบที่สามารถ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดึงดูด *C. megacephala* น่าจะประกอบด้วย แอมโมเนีย สารประกอบซัลเฟอร์ (ไดเมทิลไดซัลไฟด์ ไดเมทิลไตรซัลไฟด์ ไดเมทิลเตตระซัลไฟด์ และธาตุซัลเฟอร์) กรดอินทรีย์สายสั้น (กรดบิวทาโนอิก กรดเอทาโนอิก กรดเมทิลเพนทาโนอิก และกรดเพนทาโนอิก) ฟีนอล และอินโดล จากสารเคมีที่วิเคราะห์ได้เหล่านี้ สารเคมีเชิงพาณิชย์ ได้แก่ ไดมิลไดซัลไฟด์ 2-บิวทาโนน เอทานอล แอมโมเนีย และ2-เฮปทาโนน ถูกเตรียมใน 41 รูปแบบ ของเหยื่อสารเคมี และทดสอบกับ *C. megacephala* ทั้งในกรงเลี้ยงเป็นเวลา 5 นาที และอุโมงค์ลม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลการทดสอบระบุว่าเหยื่อสารเคมีมีประสิทธิภาพต่ำในการดึงดูดแมลงวันชนิดนี้ โดยมีเพียงแอมโมเนีย เอทานอล สารละลายไดเมทิลไดซัลไฟด์กับน้ำร้อยละ 1 และสารระเหยผสมของแอมโมเนีย/ไดเมทิลไดซัลไฟด์/เอทานอล ที่ให้ผลการดึงดูด *C. megacephala* ในระดับปานกลาง

การศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของสถานภาพทางสรีรวิทยา ต่อพฤติกรรมการตอบสนองของ *C. megacephala* ต่อเหยื่อล่อทางการดมกลิ่น โดยสถานภาพของการผสมพันธุ์ไม่มีผลในการตอบสนองของแมลงวันต่อเหยื่อล่อ เนื่องจากการตอบสนองของแมลงวันที่ยังไม่ได้ผสมพันธุ์และแมลงวันที่ผสมพันธุ์ ให้ผลการตอบสนองที่ไม่แตกต่างกันเมื่อทดสอบภายในอุโมงค์ลม แต่การมีอายุขัยเพิ่มขึ้น (5-10 วัน $\rightarrow$ 15-20 วัน$\rightarrow$ 30-35 วัน) ของแมลงวันที่ยังไม่ได้รับการผสมพันธุ์ ส่งผลให้การตอบสนองต่อเหยื่อล่อลดลง ดังการทดลองที่ใช้ AmDW เป็นเหยื่อล่อ (ค่าดัชนีบ่งชี้การดึงดูด 0.59 $\rightarrow$ 0.52$\rightarrow$ 0.40 ตามลำดับ) และจากการสังเกตพฤติกรรมการตอบสนองของ *C. megacephala* ต่อเหยื่อล่อ เป็นเวลา 5 นาที ภายในกรงเลี้ยงที่ถูกวางไว้ ณ พื้นที่ที่มีสภาวะทางภูมิอากาศแตกต่างกัน ได้แก่พื้นที่ร่มเงา ในร่มและกลางแจ้ง ผลการศึกษาพบว่า *C. megacephala* จำนวนมากตอบสนองต่อเหยื่อ AmDW ที่วางไว้ในพื้นที่มีความเข้มแสงและได้รับแสงมาก โดยมีจำนวนมากกว่าแมลงวันที่ตอบสนองต่อเหยื่อที่วางไว้ ณ ตำแหน่งที่มีความเข้มแสงและได้รับแสงปานกลางและน้อยของพื้นที่ร่มเงา และมีแมลงวันจำนวนมากตอบสนองต่อเหยื่อ เมื่อวางกรงทดสอบไว้ในพื้นที่ที่มีอุณหภูมิสูงและความชื้นสัมพัทธ์ต่ำของพื้นที่ในร่มและกลางแจ้ง นั่นแสดงให้เห็นว่าการดึงดูดของ AmDW ต่อ *C. megacephala* นั้นมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับอุณหภูมิ ความเข้มแสงและการได้รับแสง แต่มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับความชื้นสัมพัทธ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved