การพัฒนารูปแบบของแบคทีเรียร่วมอาศัยในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (*Xenorhabdus stockiae* PB09) เพื่อควบคุมไรศัตรูเห็ด (*Luciaphorus perniciosus* Rack) ในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือน

วิทยานิพนธ์

ของ

ปิยรัตน์ นามเสนา

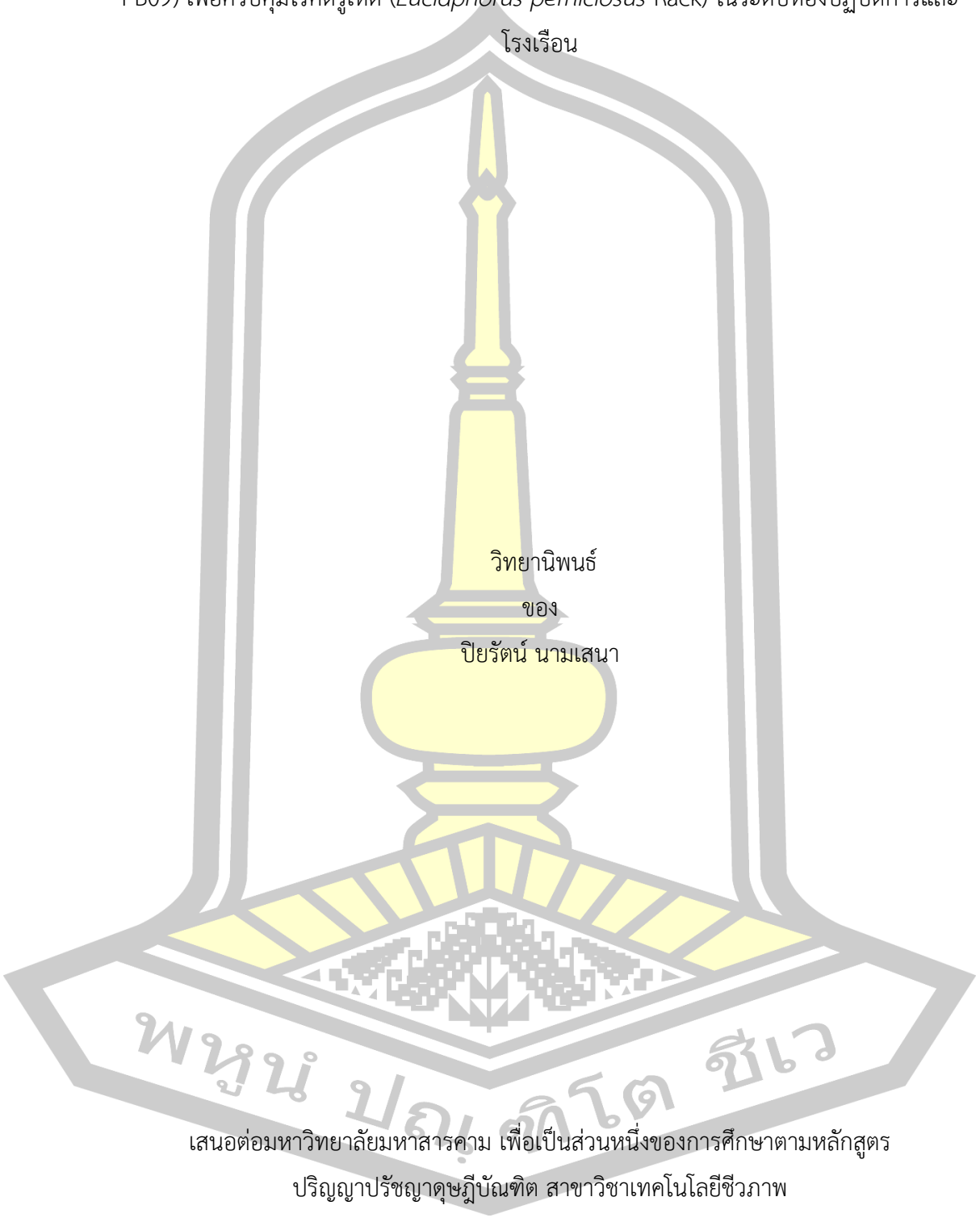
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มกราคม 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การพัฒนารูปแบบของแบคทีเรียร่วมอาศัยในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (*Xenorhabdus stockiae* PB09) เพื่อควบคุมไรศัตรูเห็ด (*Luciaphorus perniciosus* Rack) ในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือน



วิทยานิพนธ์

ของ

ปิยรัตน์ นามเสนา

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มกราคม 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Formulation development of the bacteria associated with entomopathogenic nematode (*Xenorhabdus stockiae* PB09) for controlling mushroom mite (*Luciaphorus perniciosus* Rack) in laboratory and field conditions

Piyarat Namsena

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for Doctor of Philosophy (Biotechnology)

January 2020

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวปิยรัตน์ นามเสนา แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รศ. ดร. ศิริธร ศิริอมรพรรณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผศ. ดร. ประภัสสร บุษหมั่น)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผศ. ดร. ปวีณา รัตนเสนา)

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. เกศสุคนธ์ มณีวรรณ)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ศ. ดร. อังศุมาลย์ จันทราปัตย์)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(รศ. ดร. อนุชิตา มุ่งงาม)
คณบดีคณะเทคโนโลยี

.....
(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง การพัฒนารูปแบบของแบคทีเรียร่วมอาศัยในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (*Xenorhabdus stockiae* PB09) เพื่อควบคุมไรศัตรูเห็ด (*Luciaphorus perniciosus* Rack) ในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือน

ผู้วิจัย ปิยรัตน์ นามเสนา

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประภัสสร บุษหมั่น

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปวีณา รัตนเสนา

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2563

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการพัฒนารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *Xenorhabdus stockiae* PB09 ในการทำลายไรไข่ปลาซึ่งเป็นศัตรูต่อเห็ดขอนขาวในสภาวะห้องปฏิบัติการและโรงเรือน ผลการวิจัยพบว่า แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงละลายน้ำ (wettable powder; WP) แบบน้ำเซลล์แขวนลอย (liquid cell pellet; LC) และแบบน้ำส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ (liquid supernatant; LS) มีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาที่สูงเท่ากับ 90.25, 86.50 และ 92.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) นาน 60 วัน พบว่าจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตและประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูปมีค่าลดลง โดยสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผงละลายน้ำ (WP) ยังคงมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตที่สูง และมีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาที่สูงเท่ากับ 68.08 เปอร์เซ็นต์ จึงนำแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผงละลายน้ำ (WP) มาพัฒนาสูตรแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เหมาะสม โดยทำการแปรผันส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป พบว่าส่วนประกอบที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ประกอบด้วย 1) เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียความเข้มข้น 10^8 โคโลนีต่อกรัม 2) สารตัวพาแป้งข้าวเจ้าและ 3) สารลดแรงตึงผิวน้ำมันปาล์ม โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผลิตจากส่วนประกอบแต่ละชนิดที่เหมาะสม มีอัตราการตายของไรไข่ปลาที่สูงเท่ากับ 75.56, 74.80 และ 78.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความคงตัวของประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 (WP/CS-XP) สูตรที่เหมาะสม ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลามีแนวโน้มลดลง โดยสภาวะเก็บ

รักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 180 วัน มีแนวโน้มของอัตราการตายของไรไข่ปลาในช่วง 58.67-76.66 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27.87-76.66 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) สอดคล้องกับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตในแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ที่มีแนวโน้มลดลงคงเหลือ $1.97x10^{5}$ และ $2.80x10^{3}$ โคโลนีต่อกรัม เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) นาน 180 วัน ตามลำดับ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ในระดับโรงเรือน โดยการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในสภาวะก่อนและหลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา (จำนวน 2,000 ตัวต่อก้อน) แล้วเปรียบเทียบกับสารคาร์บาริล (สารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ด) ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าโรงเรือนเพาะเห็ดที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ในสภาวะก่อนและหลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา ให้ผลผลิตเห็ดขอนขาวที่สูงเท่ากับ 118.88 และ 110.37 กรัมต่อก้อน และมีค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพของเห็ด (biological efficiency; %B.E.) เท่ากับ 37.15 และ 34.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับโรงเรือนเพาะเห็ดที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริล และผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ (proximate analysis) ของเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS พบว่ามีปริมาณโปรตีน เยื่อใยหยาบและคาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 28.86-29.70, 11.03-11.23 และ 46.47-49.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนเพาะเห็ดที่ฉีดพ่นด้วยสารคาร์บาริล และไม่พบการตกค้างของสารคาร์บาริลในตัวอย่างเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนเพาะเห็ดที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป จากผลการวิจัยสรุปได้ว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผงละลายน้ำเป็นสารชีวภาพสำเร็จรูปที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไรไข่ปลาศัตรูเห็ดขอนขาวได้ดีในระดับห้องปฏิบัติการและมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้สารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดในระดับโรงเรือน ซึ่งมีความปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพต้นแบบเพื่อประยุกต์ใช้ในการกำจัดไรศัตรูเห็ดโดยชีววิธีในระดับทางการค้าต่อไป

คำสำคัญ : แบคทีเรีย X.stockiae PB09, ไรไข่ปลา, แบคทีเรียสำเร็จรูป, แบคทีเรียผงละลายน้ำ, เห็ดขอนขาว

TITLE Formulation development of the bacteria associated with entomopathogenic nematode (*Xenorhabdus stockiae* PB09) for controlling mushroom mite (*Luciaphorus perniciosus* Rack) in laboratory and field conditions

AUTHOR Piyarat Namsena

ADVISORS Assistant Professor Prapassorn Bussaman , Ph.D.

Assistant Professor Paweena Rattanasena , Ph.D.

DEGREE Doctor of Philosophy **MAJOR** Biotechnology

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2020

ABSTRACT

The objective of this study was to develop *Xenorhabdus stockiae* PB09 as biological formulation for controlling mushroom mites (*Luciaphorus perniciosus* Rack) in laboratory and field conditions. The results showed that the different *X. stockiae* PB09 formulations, including wettable powder (WP), liquid cell pellet (LC), and liquid supernatant (LS), were found to cause very high rates of mite mortality at 90.25, 86.50, and 92.78 %, respectively. When *X. stockiae* PB09 formulations were stored at 4 ℃ and room temperature (28-32 $^{\circ}$C) for up to 60 days, their viable cells and efficacy were found to decrease. However, *X. stockiae* PB09 in wettable powder formulation could relatively maintain its both viable cells and efficacy when being stored at 4 ℃ for 60 days, resulting in the highest mite mortality at 68.08%. The wettable powder of *X. stockiae* PB09 (WP) was therefore further developed into optimal formulation by varying the ingredients. The ingredients were separately tested for 1) cell suspension at 10^{8} CFU/g 2) rice flour as carrier and 3) palm oil as surfactant and these optimal ingredients in formula could result in mite mortality at 75.56, 74.80 and 78.89%, respectively. These ingredients were then mixed and used as optimal *X. stockiae* PB09 formulation (wettable powder/cell suspension/*X. stockiae* PB09; WP/CS-XS). The investigation for consistent stability of *X. stockiae* PB09 WP/CS-XS stored at 4°C and room temperature (28-32 $^{\circ}$C) for 0, 30, 60, 90, 120,

150 and 180 days showed that the efficacy for controlling mushroom mites was found to decrease. Even though the storage at 4 $^{\circ}$C for 180 days resulted in the decrease of efficacy of *X. stockiae* PB09 WP/CS-XS for controlling mushroom mites, which ranging between 58.67-76.66%, this was still higher than that being stored at room temperature (27.87-76.66%) with significantly difference ($p<0.05$). This was similar to that viable cells of *X. stockiae* PB09 was found to decrease to 1.97×10^5 and 2.80×10^3 CFU/g when being stored at 4°C and room temperature (28-32 $^{\circ}$C) for 180 days, respectively. The efficacy of *X. stockiae* PB09 WP/CS-XS for controlling mushroom mite in field condition was tested by spraying with 1% (w/v) of *X. stockiae* PB09 WP/CS-XS on mushroom compost before and after infestation with mushroom mites (2,000 mites/bag of compost) and comparing the results with miticide (carbaryl 0.1% w/v). The results revealed that treatment with *X. stockiae* PB09 WP/CS-XS both before and after infestation with mushroom mites resulted in high mushroom yields at 118.88 and 110.37 g/bag of compost and biological efficiency (%B.E.) at 37.15 and 34.50%, respectively, which were not significantly different from carbaryl treatment (0.1% w/v). The proximate analysis of mushroom (*Lentinus squarrosulus* Mont.) treated with *X. stockiae* PB09 WP/CS-XS showed the high levels of crude protein, crude fiber and soluble carbohydrate at 28.86-29.70, 11.03-11.23 and 46.47-49.11% respectively, which were higher than the mushroom treated with miticide and there was no detectable residual carbaryl in the mushroom treated with bacterial formulation. In conclusion, WP/CS-XS, a wettable powder formulation of *X. stockiae* PB09, is shown to have high efficacy for controlling mushroom mites in both laboratory and field conditions. The wettable powder formulation of *X. stockiae* PB09 is exhibited to be safe, eco-friendly and therefore very suitable for development as prototype for commercial biopesticides products for biological control of the mushroom mites.

Keyword : Xenorhabdus stockiae PB09, Luciaphorus perniciosus Rack, Bioformulation, Wettable powder, Lentinus squarrosulus Mont.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประภัสสร บุษหมั่น ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา รัตนเสนา กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริธร ศิริอมรพรรณ ประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกศสุคนธ์ มณีวรรณ กรรมการสอบ และศาสตราจารย์ ดร. อังศุมาลย์ จันทราปัตย์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ทางด้านวิชาการ และแนะนำแนวความคิดที่เป็นประโยชน์ทั้งในด้านการเรียน การทำงานและการดำรงชีวิต รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์เรื่องสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์และห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี ที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือต่างๆ ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณพักตร์วิไล เกตุทิพย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อำนวยความสะดวกและสนับสนุนการทำวิจัยในระดับโรงเรือนเป็นอย่างดี รวมถึงฟาร์มเห็ดแม่ไพบูรณ์ บ้านทุ่งนาเรา ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม ที่ให้คำแนะนำและถ่ายทอดประสบการณ์เกี่ยวกับการทำโรงเรือนเพาะเห็ดแก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ ดร.จิรายุ สาอุตม์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย การประสานงานต่างๆ และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อประครอง นามเสนาและคุณแม่ชมเชย นามเสนา ผู้ให้ชีวิต โอกาสทางการศึกษา การอบรมสั่งสอนและกำลังใจสำคัญที่ดีที่สุดตลอดมา ขอขอบคุณน้องสาว คุณชลหทัย นามเสนา และคุณชไมพร นามเสนา ที่ให้ความช่วยเหลือ แบ่งเบาภาระในด้านต่างๆ และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

สุดท้ายประโยชน์และคุณค่าของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณบิดา-มารดาและครู-อาจารย์ ผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชา ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จและขออุทิศคุณค่าและประโยชน์ที่ได้จากการวิจัยให้กับไรไข่ปลาทุกตัวในการทำวิจัยครั้งนี้

ปิยรัตน์ นามเสนา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฏ

สารบัญภาพประกอบ ..... ฑ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 หลักการและเหตุผล 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 4

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 4

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ 6

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 7

บทที่ 2 ปริทัศน์เอกสารข้อมูล 8

2.1 แบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. 8

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. 8

2.1.2 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. 9

2.1.3 ลักษณะการก่อโรคและกลไกการเข้าทำลายตัวอ่อนของแมลง 10

2.2 ไรไข่ปลา (*Luciaphorus perniciosus* Rack) 11

2.2.1 ระยะการเจริญเติบโตของไรไข่ปลา 12

2.2.2 การทำลายและการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา 14

2.3 แบคทีเรียสำเร็จรูป 15

2.3.1 ลักษณะแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป 15
2.3.2 ส่วนประกอบที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป 16
2.3.3 รูปแบบของแบคทีเรียสำเร็จรูป 20
2.3.4 ลักษณะแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ดี 24
2.3.5 ตัวอย่างแบคทีเรียสำเร็จรูป 25
2.3.6 ข้อดีและข้อจำกัดของการใช้แบคทีเรียสำเร็จรูปในการควบคุมศัตรูพืช 26
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 27
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 34
3.1 สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการวิจัย 34
3.2 สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย 34
3.3 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย 36
3.3.1 การเตรียมการทดลอง 36
3.3.2 การทดลอง 38
3.3.2.1 การพัฒนารูปแบบแบคทีเรียร่วมอาศัยในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง เพื่อควบคุมไรศัตรูเห็ดในระดับห้องปฏิบัติการ 38
1) ศึกษารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่เหมาะสมในการทำลายไรไข่ปลา 38
2) การพัฒนารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในการทำลายไรไข่ปลา 40
3.3.2.2 การศึกษาประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูปในระดับโรงเรือน 48
3.3 รูปแบบของการวิจัย 59
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปราย 59

4.1 ผลการพัฒนารูปแบบแบคทีเรียร่วมอาศัยในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Xenorhabdus stockiae* PB09 เพื่อควบคุมไรศัตรูเห็ด (*Luciaphorus perniciosus* Rack) ในระดับห้องปฏิบัติการ 59
4.1.1 รูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่เหมาะสมในการทำลาย ไรไข่ปลา 59
4.1.2 ผลการพัฒนารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในการทำลายไรไข่ปลา 67
4.1.3 ความคงตัวของประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป 82
X. stockiae PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน 82
4.2 ประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในระดับโรงเรือน 92
4.2.1 ผลประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูปในระดับโรงเรือน 92
4.2.2 ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ (proximate analysis) และปริมาณสารเคมีตกค้างในเห็ดขอนขาว 95
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 100
5.1 สรุปผลการวิจัย 100
5.2 ข้อเสนอแนะ 103
บรรณานุกรม 104
ภาคผนวก ก ลักษณะแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS 115
ภาคผนวก ข การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาระดับโรงเรือน 117
ภาคผนวก ค ลักษณะผลผลิตเห็ดขอนขาว 119
ประวัติผู้เขียน 122

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 องค์ประกอบและตัวอย่างสารผสมในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *Bacillus* sp. 20

ตารางที่ 2 ตัวอย่างแบคทีเรียสำเร็จรูปที่จำหน่ายทางการค้า 25

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 39

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียต่างกัน 41

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ใช้สารตัวพา (carrier) ต่างชนิดกัน 43

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ต่างชนิดกัน 45

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาได้ดีที่สุด 48

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบในการผลิตก้อนเห็ดขอนขาวจำนวน 100 ก้อน 49

ตารางที่ 9 การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูปในระดับโรงเรือน 50

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 รูปแบบต่างๆ 59

ตารางที่ 11 อัตราการตายของไรไข่ปลาหลังทดสอบด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน 64

ตารางที่ 12 คุณสมบัติทางกายภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีความเข้มข้นต่างกัน 68

ตารางที่ 13 ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในแบคทีเรียสำเร็จรูป 69

ตารางที่ 14 อัตราการตายของไรไข่ปลาหลังทดสอบด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีความเข้มข้นเซลล์ต่างกัน 71

ตารางที่ 15 คุณสมบัติทางกายภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผลิตจากสารตัวพาต่างชนิดกัน 73

ตารางที่ 16 ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ใช้สารตัวพาต่างชนิดกัน 74

ตารางที่ 17 อัตราการตายของไรไข่ปลาหลังทดสอบด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผลิตจากสารตัวพาต่างชนิดกัน 77

ตารางที่ 18 คุณสมบัติทางกายภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผลิตจากสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน 78

ตารางที่ 19 ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ใช้สารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน 79

ตารางที่ 20 อัตราการตายของไรไข่ปลาหลังทดสอบด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผลิตจากสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน 81

ตารางที่ 21 ส่วนประกอบที่เหมาะสมในการพัฒนาแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 82

ตารางที่ 22 ค่าความเป็นกรด-ด่างของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน 84

ตารางที่ 23 ค่าความความหนืดของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน 84

ตารางที่ 24 ค่าความชื้นของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน 84

ตารางที่ 25 อัตราการตายของไรไข่ปลาหลังทดสอบด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน 91

ตารางที่ 26 ประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในระดับโรงเรือน 95

ตารางที่ 27 ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของเห็ดขอนขาว 98

ตารางที่ 28 ปริมาณสารคาร์บาริล (carbaryl) ตกค้างในเห็ดขอนขาว 99

สารบัญภาพประกอบ

หน้า

ภาพประกอบที่ 1 ลักษณะโคโลนีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. (A) ที่เจริญบนอาหารแข็ง..... 8

ภาพประกอบที่ 2 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับไส้เดือนฝอย 10

ภาพประกอบที่ 3 การก่อโรคและกลไกการเข้าทำลายตัวอ่อนแมลงของแบคทีเรียก่อโรคในแมลง 11

ภาพประกอบที่ 4 การพัฒนาตัวของไรไข่ปลาระยะไข่หรือระยะเอมบริโอในสภาวะอุณหภูมิห้อง .. 13

ภาพประกอบที่ 5 ลักษณะตัวเต็มวัยของไรไข่ปลา; (A) ไรไข่ปลาเพศเมีย และ (B) ไรไข่ปลาเพศผู้ 14

ภาพประกอบที่ 6 จำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิตในแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP (wettable powder) ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน..... 62

ภาพประกอบที่ 7 จำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิตในแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LC (liquid cell pellet) ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิระยะเวลาต่างกัน 62

ภาพประกอบที่ 8 จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตในแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน 86

ภาพประกอบที่ 9 การยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียบนบนสารตัวพาของแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 5,000 เท่า เมื่อ A: การเก็บรักษาที่ระยะเวลาเริ่มต้น (วันที่ 0); B: การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (นาน 180 วัน) ; C: การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส นาน 180 วัน) 86

ภาพประกอบที่ 10 แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผงละลายน้ำ (WP/CS-XS) 116

ภาพประกอบที่ 11 การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาระดับโรงเรือน 118

ภาพประกอบที่ 12 ลักษณะผลผลิตเห็ดขอนขาว 120

ภาพประกอบที่ 13 ลักษณะผลผลิตเห็ดขอนขาวที่ถูกทำลายโดยไรไข่ปลา 121

บทที่ 1
บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีการใช้สารเคมีกำจัดแมลงอย่างแพร่หลายในกระบวนการผลิต โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร สารเคมีกำจัดแมลงที่นำมาใช้ในทางการเกษตรมีหลายรูปแบบแตกต่างกัน ทั้งนี้เพื่อความเหมาะสมและสะดวกในการนำมาใช้ เช่น รูปแบบผงละลายน้ำ (wettable powder, WP) รูปแบบน้ำมัน (emulsifiable concentrate, EC) รูปแบบน้ำเข้มข้นหรือน้ำ (flowable, FL) และรูปแบบเม็ด (granule, G) เป็นต้น ซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่ใช้สารเคมีกำจัดแมลงอย่างขาดความรู้ความเข้าใจ ก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของแมลงศัตรูพืช ปัญหาสารพิษตกค้างในผลิตผลทางการเกษตร ปัญหาสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อม ปัญหาการเกิดพิษต่อตัวผู้ใช้และปัญหาการค้าระหว่างประเทศที่มีการระบุปริมาณจำกัดของสารเคมีกำจัดแมลงในผลผลิตทางการเกษตรในแต่ละประเภทต่อการนำเข้าประเทศ (อวบ สารถ้อย, 2540) และที่สำคัญการใช้สารเคมีกำจัดแมลงยังเป็นการทำลายศัตรูธรรมชาติที่ทำหน้าที่ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีอีกด้วย จากปัญหาดังกล่าวจึงทำให้ปัจจุบันหลายประเทศที่ประกอบอาชีพเกษตรกรรมหันมาใช้แนวทางในการกำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยวิธีการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมซึ่งก็คือ การควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี (biological control) เป็นการใช้สิ่งมีชีวิตหรือสารชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตและธรรมชาติ (biopesticide) เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมศัตรูพืช ซึ่งสารชีวภาพกำจัดศัตรูพืชที่ได้จากธรรมชาติสามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ด้วยกระบวนการที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยในปี ค.ศ. 2001 มีการจดทะเบียนสารออกฤทธิ์สำคัญในกลุ่มสารชีวภาพกำจัดศัตรูพืชจำนวน 195 รายการและนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ จำนวน 780 รายการ (Usta, 2013)

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีนั้นมีหลายชนิด แบคทีเรียในจีนัส *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* เป็น symbiotic bacteria ที่อาศัยร่วมกับไส้เดือนฝอยวงศ์ Steinernematidae และ Heterorhabditidae ที่มีความสามารถในการควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยได้รับการรับรองจาก The United States Environmental Protection Agency (EPA) ถึงความปลอดภัยต่อพืช สัตว์เลือดอุ่นและมนุษย์รวมทั้งปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม (Kaya and Gaugler, 1993) จึงเป็นสารชีวภาพกำจัดศัตรูพืชอีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาควบคุมแมลงศัตรูพืชได้อย่างปลอดภัย โดยเฉพาะการควบคุมไรไข่ปลา *(Luciaphorus perniciosus* Rack)

ศัตรูเห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* (Mont) Pegler) (Bussaman, Sa-Uth, Rattanasena and Chandrapatya, 2012; Bussaman, Sobanboa, Grewal and Chandrapatya, 2009) ซึ่งเป็นเห็ดที่นิยมปลูกมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และจำหน่ายเป็นรายได้กันมากเนื่องจากให้ผลผลิตเร็ว และได้ราคาดี แต่ก็ต้องประสบกับปัญหาการเข้าทำลายของไรไข่ปลาซึ่งเป็นไรที่มีขนาดเล็กมาก ตัวเต็มวัยเมื่ออยู่ในระยะตั้งท้องจะมองเห็นด้วยตาเปล่าเป็นจุดเล็กๆ สีขาวใส คล้ายไข่ปลา ไรไข่ปลานี้ชอบกัดกินส่วนของเส้นใยที่กำลังเจริญอยู่ในถุงก้อนเชื้อทั้งในระยะบ่มเส้นใยและในระยะเปิดดอก ทำให้ดอกเห็ดแคระแกร็น (เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์, 2546) วิธีการแก้ไขปัญหาของเกษตรกรผู้เพาะปลูกเห็ดส่วนใหญ่ คือการใช้สารเคมีกำจัดแมลงซึ่งเป็นวิธีการแก้ไขปัญหาที่ไม่ยั่งยืน ดังนั้นจึงมีการนำวิธีการการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยการนำแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่อาศัยร่วมกับไส้เดือนฝอยก่อโรคในแมลงมาใช้ในการควบคุมไรไข่ปลาศัตรูเห็ดขอนขาว ดังรายงานของ Bussaman et al. (2012) ที่ทำการศึกษาความสามารถในการควบคุมไรไข่ปลา *Luciaphorus* sp. ศัตรูเห็ดขอนขาวของแบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* โดยเตรียมเซลล์แบคทีเรียจำนวน 3 แบบ ได้แก่ เซลล์แขวนลอย (cell suspension) ส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ (cell free supernatant) และสารสกัดจากตัวเซลล์ (crude cell extract) พบว่า เซลล์แขวนลอยและส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* สามารถทำลายไรไข่ปลาได้สูงสุด 81.66 และ 89.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากตัวเซลล์สามารถควบคุมไรไข่ปลาได้ 30.00 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่า ไรไข่ปลาเพศเมียที่ได้รับการทดสอบด้วยเซลล์แขวนลอยและส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์มีจำนวนไข่ลดลง นอกจากนี้ Mahar, Jan, Mahar and Mahar (2008) ศึกษาการนำเซลล์แขวนลอยและส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์แบคทีเรีย *X. nematophila* ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ได้แก่ หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exgua* (Hubner)) หนอนใยผัก (*P. xylostella* (Linnaeus)) ตัวอ่อนด้วงพวงองุ่น (*Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius)) และตัวอ่อนตั๊กแตน (*Schistocerca gregaria* (Forskal)) พบว่าเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียและส่วนใสที่ผ่านการกรอง สามารถฆ่าแมลงศัตรูพืชทั้ง 3 ชนิดได้ การเก็บเกี่ยวเซลล์แบคทีเรีย *X. nematophila* จากช่องว่างกลางลำตัวของแมลงแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *X. nematophila* สามารถอยู่ในสภาวะแวดล้อมภายนอกลำไส้ของไส้เดือนฝอยได้ และเมื่อทดสอบความคงตัวของความเป็นพิษของแบคทีเรียต่อหนอนกินรังผึ้งซึ่งอยู่ในดิน พบว่าแบคทีเรียมีความเป็นพิษต่อหนอนกินรังผึ้งนาน 5 เดือน เห็นได้ว่าสารชีวภาพกำจัดศัตรูพืชจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. มีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาศัตรูเห็ดขอนขาวและแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นๆ ได้สูง แต่เกษตรกรไม่นิยมนำมาใช้เช่นเดียวกับการควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นๆ ซึ่งส่วนใหญ่เกษตรกรยังนิยมใช้สารเคมีกำจัดแมลง ดังรายงานข้อมูลที่พบว่าประเทศไทยมีแนวโน้มการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่สูงขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 โดยในปี พ.ศ. 2560 มีการนำเข้า

สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในปริมาณที่สูงถึง 160,687,089.48 กิโลกรัม แบ่งเป็นสารออกฤทธิ์ (active ingredient) 84,379,251.69 กิโลกรัม โดยสารออกฤทธิ์กำจัดศัตรูพืชที่นำเข้า ได้แก่ สารกำจัดแมลง (insecticide) สารป้องกันกำจัดโรคพืช (fungicide) สารกำจัดวัชพืช (herbicide) และสารกำจัดไร (acaricide) (ฝ่ายข้อมูลเครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช, 2560) แสดงให้เห็นว่าเกษตรกรไทยมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในแต่ละปีมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ สาเหตุที่เกษตรกรไม่นิยมนำสารชีวภาพกำจัดศัตรูพืชมาใช้การควบคุมแมลงศัตรูพืช เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงต่อศัตรูพืชที่สูง ประสิทธิภาพต่ำ เห็นผลช้า และให้ผลที่ได้ไม่แน่นอนเมื่อนำมาใช้ในสภาวะแปลงปลูก เช่นเดียวกับการใช้เซลล์แขวนลอยหรือส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ออกแล้วของแบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดต่างๆ มักนำมาใช้ในการควบคุมศัตรูพืชโดยตรงซึ่งจะมีประสิทธิภาพสูงเมื่อทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ แต่กลับมีประสิทธิภาพลดลงเมื่อใช้ในสภาวะแปลงจริง และยากต่อการนำไปใช้งาน การเก็บรักษา และการขนส่ง ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาและพัฒนาเกี่ยวกับการเปลี่ยนรูปแบบหรือนำเซลล์แขวนลอยและส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์มาผลิตในรูปแบบของแบคทีเรียสูตรสำเร็จแบบต่างๆ เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมศัตรูพืช โดยการตรึงเซลล์และผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียเพื่อช่วยยืดอายุของแบคทีเรียให้อยู่ในตัวกลางในรูปแบบต่างๆ เช่น แบบน้ำ (liquid formulation) แบบผง (powder formulation) แบบแกรนูล (granule formulation) และแบบเม็ด (granule, pellet formulation) เป็นต้น เพื่อความสะดวกต่อการนำไปใช้ การเก็บรักษา สะดวกต่อการค้า ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ และการนำไปประยุกต์ใช้จริง (Nakkeeran, Fernando, and Siddiqui, 2006) การผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปในการควบคุมแมลงศัตรูพืชมีหลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรีย *Bacillus thuringeinsis* (Bt) เช่น การผลิตในแบคทีเรียสำเร็จรูปชนิดสารแขวนลอยเข้มข้น (suspension concentrate) แบบน้ำและแบบแกรนูลละลายน้ำ ซึ่งแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 3 แบบ สามารถควบคุมหนอนผีเสื้อกลางคืน *Lymantria dispar* L. และหนอน *Malacosoma neustria* L. แมลงศัตรูพืชไม้โอ๊คได้สูง (Ruiu, Mannu, Falchi, Braggio and Luciano, 2013) และยังสามารถควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera littoralis* (Fabricius) วัย 2 ได้ดี (LC_{90} 0.418 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. megaterium* แบบแคปซูลแขวนลอยสามารถควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคใบไหม้ในข้าวได้มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ มีอายุการเก็บรักษานาน 12 เดือน และมีความทนต่อรังสียูวี (Wiwattanapatapee, Chumthong, Pengnoo and Kanjanamaneesathian, 2013)

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการศึกษาการพัฒนารูปแบบแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ซึ่งเป็นแบคทีเรียร่วมอาศัยในไส้เดือนฝอยก่อโรคในแมลง ให้อยู่ในรูปของแบคทีเรียสำเร็จรูปในแบบต่างๆ คือ รูปแบบน้ำ และผงละลายน้ำ ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไรไข่ปลาศัตรูเห็ดขอนขาวในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือน เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพสำเร็จรูป

ที่ใช้ควบคุมและแก้ปัญหาการแพร่ระบาดของไรศัตรูเห็ดที่ก่อความเสียหายให้กับผลผลิตทางการเกษตรต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่เหมาะสมในการทำลายไรไข่ปลา
2. เพื่อศึกษาการพัฒนารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีประสิทธิภาพ ในการทำลายไรไข่ปลาในระดับห้องปฏิบัติการ
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาสภาวะอุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างกัน
4. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในการทำลายไรไข่ปลาในระดับโรงเรือน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1) การพัฒนารูปแบบแบคทีเรียร่วมอาศัยในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *X. stockiae* PB09 เพื่อควบคุมไรศัตรูเห็ด (*L. perniciosus*) ในระดับห้องปฏิบัติการ

1. ศึกษารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่เหมาะสมในการทำลายไรไข่ปลา โดยตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่

1.1 ตัวแปรอิสระ

1.1.1 แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09

รูปแบบผงละลายน้ำ (wettable powder)

รูปแบบน้ำ (liquid formulation)

1.1.2 แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) นาน 0, 15, 30, 45, และ 60 วัน

1.1.3 สารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ด propargite

1.2 ตัวแปรตาม

1.2.1 อัตราการตายของไรไข่ปลา

1.2.2 จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิต

2. ศึกษาการพัฒนารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาในระดับห้องปฏิบัติการ โดยตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่

2.1 ตัวแปรอิสระ

2.1.1 แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09

2.1.2 แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาสูงสุด ได้แก่ รูปแบบผงละลายน้ำ (wettable powder)

2.1.3 แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีความเข้มข้นเซลล์ต่างกัน ได้แก่ $2.98x10^{8}$, $2.92x10^{7}$, $2.63x10^{6}$ และ $1.57x10^{5}$ โคโลนีต่อกรัม

2.1.4 แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผลิตจากสารตัวพาต่างชนิดกัน ได้แก่ แป้งข้าวโพด (corn starch) แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) แป้งข้าวเจ้า (rice flour) ผงทัลคัม (talcum) และดินขาว (kaolinite)

2.1.5 แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีผลิตจากสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน ได้แก่ น้ำมันมะกอก (olive oil) น้ำมันข้าวโพด (corn oil) น้ำมันปาล์ม (palm oil) และน้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil)

2.1.6 สารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ด propargite

2.2 ตัวแปรตาม

อัตราการตายของไรไข่ปลา

3. ศึกษาประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลาต่างกัน โดยตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่

3.1 ตัวแปรอิสระ

3.1.1 แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09

3.1.2 แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ได้รับการพัฒนาและผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน

3.1.3 สารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ด propargite

3.2 ตัวแปรตาม ได้แก่

3.2.1 จำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิต

3.2.2 อัตราการตายของไรไข่ปลา

3.2.3 คุณสมบัติทางกายภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09

1.3.2) การศึกษาประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในระดับโรงเรือน โดยตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่

1. ตัวแปรอิสระ
   1.1 แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09
   1.2 สารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริล (carbaryl)
2. ตัวแปรตาม ได้แก่
   2.1 ผลผลิตเห็ดขอนขาว
   2.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพ (% biological efficiency; %B.E.)
   2.3 คุณค่าทางโภชนาการ (proximate analysis) ของเห็ดขอนขาว
   2.4 ปริมาณสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริลที่ตกค้างในเห็ดขอนขาว

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ

1. Symbiotic bacteria หมายถึง แบคทีเรีย *Photorhabdus* sp. และ *Xenorrhabdus* sp. ที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้ของไส้เดือนฝอยสกุล *Heterorhabditis* และ *Steinernema* ก่อโรคในแมลงตามลำดับ

2. *Luciaphorus perniciosus* Rack หมายถึง ไรไข่ปลาซึ่งเป็นศัตรูสำคัญของเห็ดขอนขาวและเห็ดหลายชนิด จะแพร่กระจายได้ง่ายโดยติดไปกับก้อนเชื้อหรือวัสดุเพาะเห็ด

3. Biopesticides หมายถึง สิ่งมีชีวิตหรือสารชีวภาพที่ได้จากสิ่งมีชีวิตและธรรมชาติ เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งนำมาใช้ในการควบคุมศัตรูพืช

4. Cell suspension หมายถึง เซลล์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแบบเหลว

5. Cell free supernatant หมายถึง ส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp.

6. Crude cell extract หมายถึง ส่วนของเซลล์แบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ที่ได้จากการกรองเซลล์แขวนลอยและกระจายเซลล์ในสารละลาย 0.85% NaCl

7. Wettable powders (WP) หมายถึง แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงละลายน้ำ เป็นสูตรแห้งอนุภาคบดละเอียดสามารถนำมาใช้ได้หลังการละลายในน้ำ

8. Capsule suspension (CS) หมายถึง แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบแคปซูลแขวนลอย เป็นสารออกฤทธิ์แขวนลอยจากจุลินทรีย์ที่ห่อหุ้มด้วยแคปซูลที่มีความคงตัวที่ผลิตจากเจลาติน แป้ง เซลลูโลสและโพลีเมอร์อื่นๆ ต้องเจือจางน้ำก่อนนำไปใช้

9. Soluble concentrate (SC); Flowable (FL) หมายถึง แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำแบบเข้มข้นต้องเจือจางน้ำก่อนนำไปใช้

10. Emulsifiable concentrate (EC) หมายถึง แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบอิมัลชั่นเข้มข้นประกอบด้วยของเหลวที่ละลายในของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ผสมตัวกัน (ขนาดของหยดของเหลวที่กระจายมีขนาด 0.1-10 ไมโครเมตร) ต้องเจือจางน้ำก่อนนำไปใช้

11. Granule (G, GR) หมายถึง แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบแกรนูล เป็นสารออกฤทธิ์จากจุลินทรีย์ที่ผสมส่วนประกอบและขึ้นรูปเป็นแกรนูล ส่วนใหญ่ต้องละลายน้ำก่อนนำไปใช้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้รูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่เหมาะสมในการทำลายไรไข่ปลาในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือน และได้ต้นแบบผลิตภัณฑ์ชีวภาพสำเร็จรูป (bioproduct) เพื่อนำไปพัฒนาหรือต่อยอดให้เป็นผลิตภัณฑ์การเกษตรทางการค้าพร้อมนำใช้ในการควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของไรศัตรูเห็ด เป็นแนวทางการลดการใช้สารเคมีในการทำการเกษตรและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

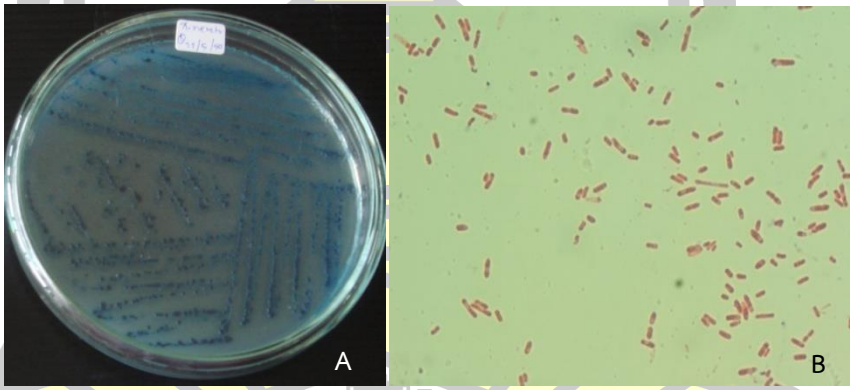
พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 2
ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

2.1 แบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp.

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp.

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยร่วมกับไส้เดือนฝอยก่อโรคในแมลงวงศ์ Steinernematidae แบบพึ่งพาซึ่งกันและกัน(symbiotic bacteria) จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae (Forst and Nealson, 1996) มีรูปร่างเป็นท่อน ขนาดเฉลี่ย 0.8-2.0 x 4-10 ไมโครเมตร ลักษณะโคโลนีสีน้ำเงินบนอาหารแข็ง NBTA (ภาพประกอบที่ 1) เจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถเคลื่อนที่ได้ (motile) มีแฟลกเจลลารอบตัว (peritri-chously flagella) (Thomas, George and Poinar, 1979) แบคทีเรีย *Xenorhabdus* spp. จะเข้าไปอาศัยอยู่ภายในลำไส้ของไส้เดือนฝอยในระยะ infective juvenile หรือ IJ



ภาพประกอบที่ 1 ลักษณะโคโลนีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. (A) ที่เจริญบนอาหารแข็ง NBTA และเซลล์แบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. (B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (ปิยรัตน์ นามเสนา, 2553)

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* spp. มีการเจริญเติบโต 2 ระยะ คือ

1. phase I แบคทีเรียในระยะนี้สามารถแยกได้จากไส้เดือนฝอยที่อยู่ในระยะตัวอ่อนวัยที่ 3 ซึ่งเป็นระยะ infective juvenile แบคทีเรียในไส้เดือนฝอยระยะนี้เป็นระยะที่เซลล์มีการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) การดูดซับสี การผลิตเอนไซม์ lipase phospholipase และ protease ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และชนิดของแบคทีเรีย เช่น เซลล์ของแบคทีเรีย *Photorhabdus*

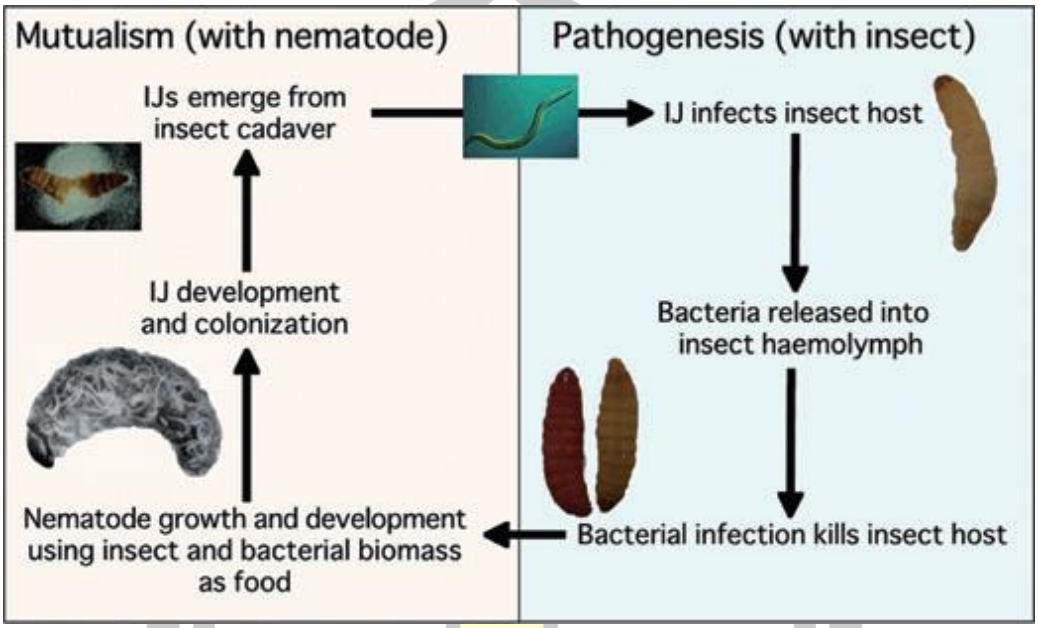
spp. ที่อาศัยร่วมกับไส้เดือนฝอยวงศ์ Heterorhabditidae สามารถสร้างสีหรือเกิดการเรืองแสงได้ แบคทีเรีย *Xenorhabdus* spp. ที่อยู่ใน phase I จะมีขนาดโคโลนีเล็กกว่าแบคทีเรียที่อยู่ใน phase II รูปร่างของเซลล์เมื่ออยู่ใน phase I จะเป็นแบบแท่ง (rod-shape) 80-90 เปอร์เซ็นต์ และแบบกลม (spheroplast) 10-20 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ในระยะนี้สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่ติดอยู่โดยรอบลำตัว (peritichous flagella) และมีการสร้างโคโลนีเป็นกลุ่มบนแผ่นวุ้น การรวมตัวของเซลล์เป็นแบบ protoplasmic และมีชั้นของ glycocalyx ที่หนา โคโลนีของแบคทีเรียชนิดนี้มีสีแดงชมพูใสๆ หรือแดงอมน้ำตาล โคโลนีมีรูปร่างกลม ขอบไม่เรียบ นูนโค้งจากผิวหน้าของอาหาร ผิวหน้าของโคโลนีเป็นเม็ดๆ และโคโลนีมีลักษณะทึบแสง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียจนถึงระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) หรือเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยบนอาหารเทียมส่งผลให้แบคทีเรียเจริญเข้าสู่ระยะ phase II

2. phase II แบคทีเรียระยะนี้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยมีคุณสมบัติบางอย่างของเซลล์ที่อยู่ใน phase II จะลดลงหรือขาดหายไป โคโลนีของแบคทีเรียใน phase II ที่ใหญ่กว่าโคโลนีของ phase I โคโลนีมีสีเหลืองอ่อน น้ำตาลหรือเทาขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย รูปร่างของโคโลนีจะไม่แน่นอน ขอบไม่เรียบ แบนราบไปตามผิวหน้าของอาหาร ผิวหน้าของโคโลนีเป็นเม็ดๆ ไม่ทึบแสง (Forst, Dowds, Boemare and Stackebrandt, 1997)

2.1.2 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp.

ไส้เดือนฝอยระยะ IJ จะเข้าสู่ระบบเลือดของแมลงทางระบบหายใจหรือผ่านทางช่องเปิดตามลำตัว เช่น ปากและทวารหนักหรืออาจเจาะทะลุผ่านเข้าทางผิวหนังของตัวอ่อนของแมลงได้ โดยตรงภายหลังจากที่เข้าสู่ตัวอ่อนของแมลงแล้วไส้เดือนฝอยจะปล่อยแบคทีเรียเข้าสู่กระแสเลือดของตัวอ่อนของแมลง แบคทีเรียและไส้เดือนฝอยจะฆ่าตัวอ่อนของแมลงอย่างรวดเร็ว โดยแบคทีเรียจะปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยอวัยวะต่างๆ ของตัวอ่อนของแมลงซึ่งจะเป็นอาหารของไส้เดือนฝอยต่อไป (Owuama, 2001) หลังจากที่ไส้เดือนฝอยกินเนื้อเยื่อที่ย่อยสลายของแมลงแล้วก็จะมีการเจริญและสืบพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนอยู่ภายในซากตัวอ่อนของแมลง เมื่อไส้เดือนฝอยรุ่นลูกเจริญเข้าสู่ระยะ infective juvenile จะเคลื่อนออกจากซากแมลงตัวเดิมเพื่อหาเหยื่อรายใหม่ต่อไป ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการทำลายแมลงขึ้นอยู่กับสภาพความพร้อมของวงจรชีวิตไส้เดือนฝอย และการศึกษาการอยู่รอดของแบคทีเรียในดินถือว่าเป็นประโยชน์มาก เนื่องจากการหมุนเวียนวงจรชีวิตของแบคทีเรียจะเป็นส่วนสำคัญต่อการทำลายแมลงอาศัย นอกจากนี้แบคทีเรีย *Xenorhabdus* spp. สามารถเจริญได้อย่างอิสระภายใต้สภาวะมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ เมื่อแบคทีเรียเจริญอยู่ในช่วง stationary phase แบคทีเรียจะปล่อยสารเมตาบอไลท์หลายชนิด (Forst et al., 1997) สารที่แบคทีเรียปล่อยออกมาจะเข้าสู่ระบบเลือดของตัวอ่อนแมลง นอกจากนั้นแบคทีเรียยังปล่อย

เอนไซม์ ที่ทำหน้าที่ย่อยเนื้อเยื่อของแมลงให้มีโมเลกุลเล็กลง เพื่อให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย ดังภาพประกอบที่ 2

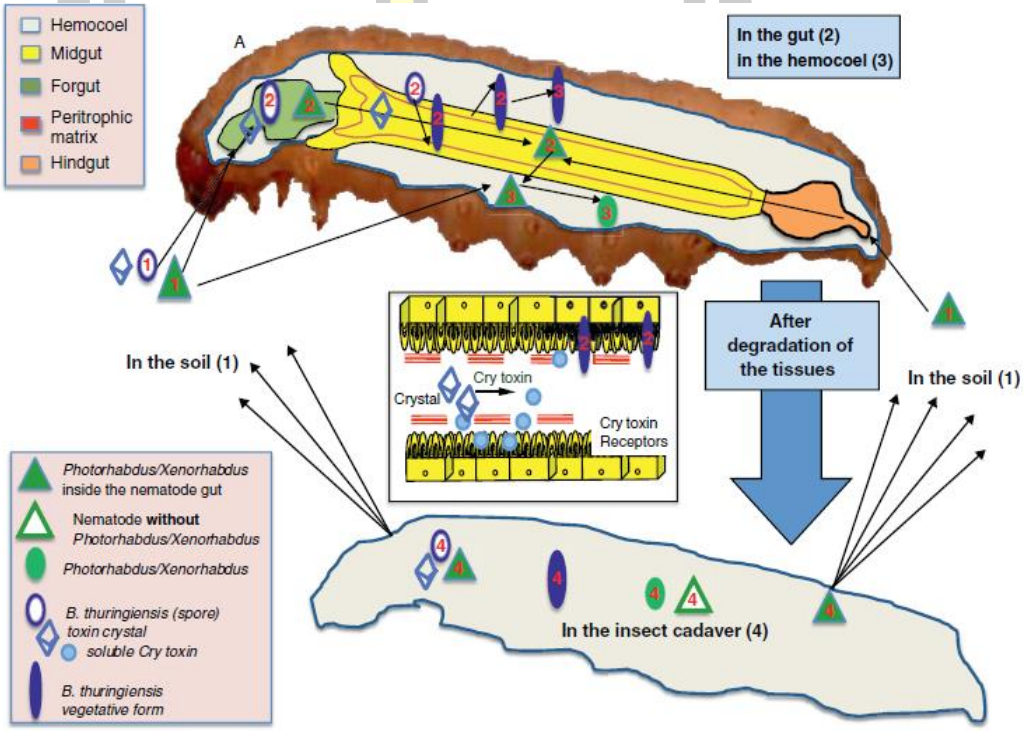


ภาพประกอบที่ 2 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับไส้เดือนฝอย (Goodrich-Blair and Clarke, 2007)

2.1.3 ลักษณะการก่อโรคและกลไกการเข้าทำลายตัวอ่อนของแมลง

กลไกการเข้าทำลายตัวอ่อนแมลงของไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันจะเกิดขึ้นโดยไส้เดือนฝอยจะเข้าสู่ตัวอ่อนแมลงศัตรูพืช โดยเข้าทางปากเป็นส่วนใหญ่ หรืออาจจะเข้าทางทวารและรูหายใจหรือรูเปิดต่างๆ ของแมลงศัตรูพืช (Forst and Nealson, 1996) โดยจะชอนไชเข้าสู่กระแสเลือดและเจริญเติบโตในตัวแมลง ขณะเดียวกันก็จะขับถ่ายเอาแบคทีเรียที่ติดอยู่ที่ลำไส้ออกมา และแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตสารพิษต่างๆ ที่ส่งผลต่อการตายของตัวอ่อนแมลง ได้แก่ Toxin complexes (Tc), hydrolytic enzymes และสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) โดยสารกลุ่ม Toxin complexes (Tc) ส่งผลทำให้แมลงเกิดภาวะ toxemia เกิดภาวะอัมพาต กิจกรรมต่างๆ ภายในร่างกายหยุดชะงัก และยังทำลายต่อมที่ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนในแมลงด้วย (Nielsen-LeRoux, Gaudriault, Ramarao, Lereclus and Givaudan, 2012) และเอนไซม์กลุ่ม hydrolytic enzymes ได้แก่ chitinase, lipase, phospholipase และ protease โดยกลุ่มเอนไซม์ดังกล่าวจะทำลายเนื้อเยื่อแมลง เช่น fat body ทำให้แมลงเกิดการเน่าเปื่อยและยังสามารถผลิตเอนไซม์ haemolysin มาทำลายเม็ดเลือดของแมลงศัตรูพืชได้อีกด้วย (Forst and Nealson, 1996) และสาร secondary metabolites เป็นสารปฏิชีวนะ

เช่น xenocoumacins xenorhabdin และ xenoxide มีบทบาทในการป้องกันและทำลายการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ภายในซากแมลงที่ถูกแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย (Bode, 2009) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้แมลงตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง และยังส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของแมลงทำให้เกิดความผิดปกติ และทำให้ระบบเลือดเกิดการติดเชื้อ (Leulier et al., 2003) โดยความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีค่าต่างกันตามชนิดของแบคทีเรียและชนิดของเหยื่อที่แบคทีเรียเข้าทำลาย ดังแสดงในภาพประกอบที่ 3



ภาพประกอบที่ 3 การก่อโรคและกลไกการเข้าทำลายตัวอ่อนแมลงของแบคทีเรียก่อโรคในแมลง *Bacillus thuringiensis*, *Photorhabdus* และ *Xenorhabdus* (Nielsen-LeRoux et al., 2012)

2.2 ไรไข่ปลา (*Luciaphorus perniciosus* Rack)

ไรไข่ปลาเป็นไรศัตรูเห็ดที่สำคัญก่อให้เกิดความเสียหายต่อการเพาะปลูกเห็ดในประเทศไทย มีขนาดเล็กมากจนต้องอาศัยแว่นขยายจึงสามารถมองเห็นได้ชัดเจน สามารถทำลายเห็ดได้ทุกระยะการเจริญตั้งแต่ระยะการสร้างเส้นใยจนถึงระยะการสร้างสปอร์ ส่งผลให้ผลผลิตเห็ดลดลงประมาณ 50-80 เปอร์เซ็นต์ (Bussaman et al., 2017) ตามสภาพธรรมชาติมักเห็นไรไข่ปลาเป็นจุดเล็กๆ

สีขาวใสหรือน้ำตาลอ่อนอยู่กระจายเต็มไปหมดคล้ายไข่ปลา ไรไข่ปลามีวงจรชีวิตที่สั้นโดยใช้เวลาเพียง 4-5 วันในการเจริญเติบโตจากไข่เป็นตัวเต็มวัย โดยทั่วไปจะพบไรเพศเมียมากกว่าเพศผู้ถึง 4 เท่า นอกจากนั้นไรเพศเมียยังสามารถขยายพันธุ์ได้ด้วยการออกไข่ซึ่งฟักออกเป็นตัวโดยไม่จำเป็นต้องได้รับการผสมพันธุ์กับเพศผู้ ส่งผลให้ไรสามารถเพิ่มปริมาณมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่เส้นใยเห็ดกำลังแผ่ออกไป หากมีการระบาดของไรจะทำให้เส้นใยขาดออกจากกัน และไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล, 2537) ไรไข่ปลาสามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว โดยแพร่กระจายไปตามอากาศ การขนส่ง เครื่องมือหรือวัสดุที่มีการปนเปื้อน และส่วนผสมในการผลิตก้อนเห็ด พบการแพร่ระบาดของไรไข่ปลาครั้งแรกในเห็ดหูหนู (*Auricularia polytricha* (Mont.)) และพบการแพร่กระจายของไรไข่ปลาในหลายจังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ กรุงเทพมหานคร ราชบุรี เพชรบุรี มหาสารคาม กาฬสินธุ์ ร้อยเอ็ด ขอนแก่น และอุบลราชธานี (Bussaman et al., 2017)

2.2.1 ระยะการเจริญเติบโตของไรไข่ปลา

การเจริญเติบโตของไรไข่ปลาแบ่งออกเป็น 2 ระยะ ดังนี้

2.2.1.1 ระยะไข่ หรือระยะเอมบริโอ ประกอบด้วย 5 ระยะ ได้แก่

ไข่ระยะที่ 1 มีเยื่อหุ้มสีเหลืองอ่อน (ใส) ไข่เป็นรูปยาวรีมีสีขาวปนเทาบริเวณตรงกลางจะขุ่นมากกว่าบริเวณขอบ ที่ติดอยู่กับเปลือกไข่ ขนาดความกว้างของไข่โดยเฉลี่ย 106 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 145 ไมโครเมตร พบไข่ระยะนี้ในตัวแม่ที่มีอายุ 60-216 ชั่วโมง (ภาพประกอบที่ 4A)

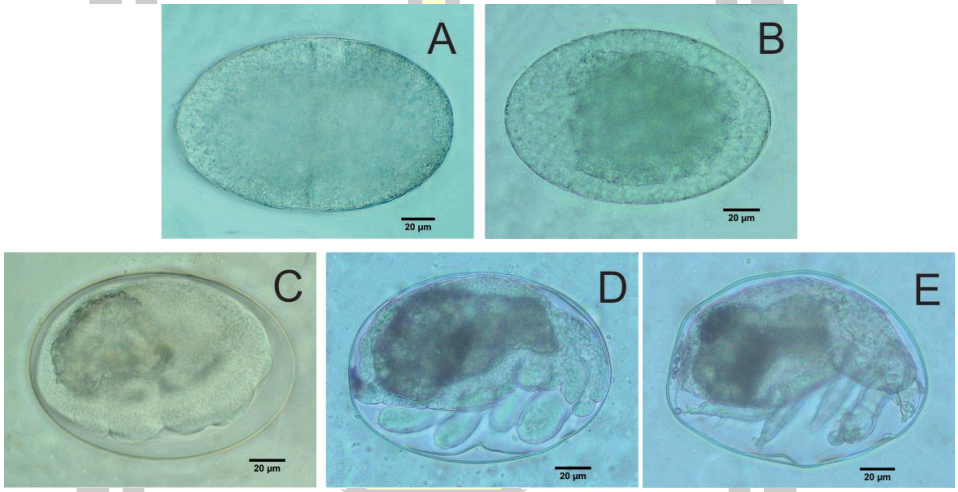
ไข่ระยะที่ 2 ไข่แดงมีสีขุ่นเข้มมากขึ้นและเนื้อไข่ภายในเปลือกไม่แบ่งแยกออกเป็น 2 ส่วน เหมือนระยะที่ 1 โดยจะเป็นสีเดียวกันหมดและอยู่บริเวณตรงกลางของไข่ชัดเจน ไข่ระยะนี้มีขนาดกว้างเฉลี่ย 101 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 140 ไมโครเมตร พบไข่ระยะนี้ในตัวแม่ที่มีอายุ 60-192 ชั่วโมง (ภาพประกอบที่ 4B)

ไข่ระยะที่ 3 ไขระยะนี้มีตุ่มรยางค์เกิดขึ้น มี 8 ตุ่ม ซึ่งต่อมาจะเจริญเป็นส่วนขา พบไข่ระยะนี้ในตัวแม่ที่มีอายุ 60-192 ชั่วโมง (ภาพประกอบที่ 4C)

ไข่ระยะที่ 4 ตัวอ่อนมีกาสร้างรยางค์ครบและยื่นยาวออกมาแต่ยังไม่มีขนเกิดตามรยางค์ โดยรยางค์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะป้อมสั้นและสามารถมองเห็นอวัยวะส่วนปาก (gnathosoma) ได้ชัดเจน ยังไม่สามารถแยกเพศของไรได้ ไข่มีขนาดกว้างเฉลี่ย 101 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 141 ไมโครเมตร พบไข่ระยะนี้ในตัวแม่ที่มีอายุ 84-204 ชั่วโมง (ภาพประกอบที่ 4D)

ไข่ระยะที่ 5 ตัวอ่อนภายในไข่เจริญมากขึ้น เห็นส่วนปากชัดเจน ส่วนขาเริ่มเรียวแหลมและมีขน (setae) ขึ้นทั่วไปรวมทั้งบริเวณลำตัวด้วย ไข่ในระยะนี้สามารถแยกเพศได้ชัดเจน

ไข่ที่เจริญเป็นตัวผู้อวัยวะส่วนปากไม่เจริญแต่อวัยวะสืบพันธุ์เจริญดีเห็นได้ชัดเจน ไข่ที่เจริญเป็นตัวผู้จะมีขนาดกว้างเฉลี่ย 94 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 136 ไมโครเมตร ส่วนไข่ที่เจริญเป็นตัวเมียมีขนาดกว้างเฉลี่ย 99 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 143 ไมโครเมตร พบไข่ระยะนี้ในตัวแม่ที่มีอายุ 84-216 ชั่วโมง โดยไรไข่ปลาเพศผู้จะมีการเคลื่อนที่เร็วและไม่พบการพัฒนาตัวของอวัยวะส่วนปาก (ภาพประกอบที่ 4E) (Bussaman et al., 2017; กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์, พรทิพย์ วิสารทานนท์, ฉัตรไชย ศฤงฆไพบูลย์ และสัจจะ ประสงค์ทรัพย์, 2544)



ภาพประกอบที่ 4 การพัฒนาตัวของไรไข่ปลาระยะไข่หรือระยะเอมบริโอในสภาวะอุณหภูมิห้อง (A) ไข่ระยะที่ 1, (B) ไข่ระยะที่ 2, (C) ไข่ระยะที่ 3, (D) ไข่ระยะที่ 4 และ (E) ไข่ระยะที่ 5 (Bussaman et al., 2017)

2.2.1.2 ระยะตัวเต็มวัย

เมื่อตัวอ่อนภายในไข่เจริญเติบโตจนเป็นตัวเต็มวัยและมีการผสมพันธุ์กันในท้องแม่แล้วก็เจาะเปลือกไข่ออกมาอยู่ภายในท้องของไรตัวแม่ระยะหนึ่ง จากนั้นท้องไรตัวแม่จะแตกออก ไรตัวเต็มวัยที่เกิดขึ้นก็จะแพร่กระจายออกมาเพื่อหาอาหารแหล่งใหม่ต่อไป

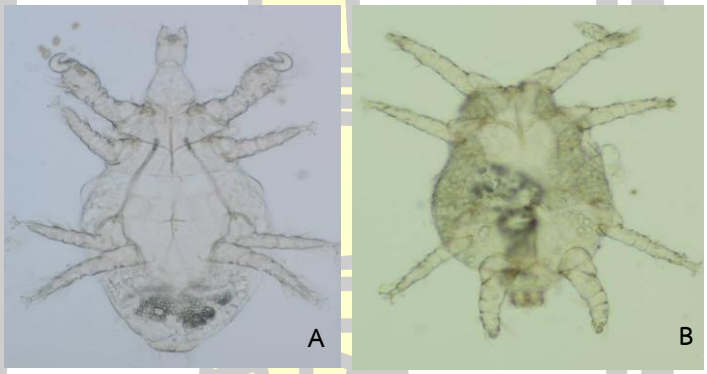
ไรตัวเต็มวัยเพศเมีย

ไรตัวเต็มวัยเพศเมียที่ออกจากท้องของไรตัวแม่ใหม่ๆ นั้น จะมีรูปร่างยาวรี สีเหลืองอ่อนใส มีขา 4 คู่ ขาคู่แรกโตกว่าขาคู่อื่นๆ ส่วนของ apotele จะเป็น claw ขนาดใหญ่ ใช้ในการเกาะเกี่ยวและเคลื่อนไหว ส่วนขาคู่ที่ 2, 3 และ 4 นั้น จะมีขนาดใกล้เคียงกัน ไรเพศเมียใช้ขาคู่ที่ 2, 3 และ 4 ในการเดิน ส่วนขาคู่แรกใช้รับความรู้สึกโดยชี้ตรงไปข้างหน้าและสั่นอยู่ตลอดเวลา ทางด้านท้ายของลำตัว (caudal setae) มีเส้นขนข้างละคู่ ขนาดลำตัวกว้างเฉลี่ย 63 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 144 ไมโครเมตร เมื่อเดินหาอาหารเป็นเวลานานประมาณ 1.3 วัน

ครึ่ง จะเกาะนิ่งอยู่กับที่นานประมาณ 1 วัน จากนั้นลำตัวจะค่อยๆ โป่งออกเรื่อยๆ มีลักษณะคล้ายหยดน้ำหรือไข่ปลา หลังจาก 4 วันจะพบเม็ดไข่เล็กๆ ติดอยู่กับสายใยซึ่งต่อมาจากปากของไรพันกันอยู่ภายในท้องแม่คล้ายพวงองุ่น เมื่อไรมีอายุมากขึ้นส่วนของลำตัวจะมีสีเหลืองเข้มขึ้น ขนาดของลำตัวโตเต็มที่เฉลี่ย 1.31 มิลลิเมตร ตัวเต็มวัยเพศเมียที่ได้รับการผสมพันธุ์และไม่ได้รับการผสมพันธุ์ มีอายุเฉลี่ยนาน 9.07 วัน และ 12.25 วัน ตามลำดับ ดังภาพประกอบที่ 5(A)

ไรตัวเต็มวัยเพศผู้

มีลักษณะที่แตกต่างจากเพศเมียอย่างชัดเจน คือเพศผู้จะมีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมีย รูปร่างแบนคล้ายปลาดาว ลำตัวมีขนาดกว้างเฉลี่ย 73 ไมโครเมตร ยาวเฉลี่ย 93 ไมโครเมตร ผนังลำตัวมีสีเหลืองใส ไรเพศผู้เคลื่อนไหวอยู่ตลอดเวลาส่วนปากไม่เจริญแต่อวัยวะสืบพันธุ์เจริญดี มีลักษณะยื่นยาวออกมาเห็นชัดเจน ปลายขาคู่ที่ 1 ส่วนของ apotele จะแผ่ออกเป็น sucker ใช้สำหรับยันตัวเองให้ถอยหลังไปผสมพันธุ์กับเพศเมียได้สะดวก ส่วนปลายขาคู่ที่ 4 มี apotele เป็นตะขอ (claw) อันเล็กๆ ใช้เกาะเกี่ยวเพศเมียเวลาผสมพันธุ์ อายุตัวเต็มวัยเพศผู้เฉลี่ย 7.03 วัน ดังภาพประกอบที่ 5(B)



ภาพประกอบที่ 5 ลักษณะตัวเต็มวัยของไรไข่ปลา; (A) ไรไข่ปลาเพศเมีย และ (B) ไรไข่ปลาเพศผู้ (จิรายุ สาอุตม์, 2557)

2.2.2 การทำลายและการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา

ไรไข่ปลาในระยะก่อนท้องหลังจากที่ออกมาจากท้องแม่แล้ว เป็นสาเหตุสำคัญในการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา โดยไรจะเริ่มระบาดจากปากถุงลงสู่ก้นถุง จากนั้นก็จะระบาดออกสู่ภายนอกถุงทางจุกสำลีที่อุดปากถุงหรือปากขวด และจะเข้าสู่ปากถุงก้อนเชื้อใหม่ที่อยู่ข้างเคียง ทำให้แพร่กระจายเป็นวงกว้างมากขึ้น (กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ และคณะ, 2544) ถ้ามีการระบาดของไรไข่ปลามากๆ จะมองเห็นคล้ายผงฝุ่นอยู่เต็มบริเวณปากถุงและชั้นวางถุง ไรชนิดนี้สามารถแพร่ระบาดทำลายหัวเชื้อบริสุทธิ์ในขวดหัวเชื้อ และถุงก้อนเชื้อได้อย่างรวดเร็วโดยผ่านเข้าทางจุกสำลี

ที่อุดปากถุงหรือปากขวด และเนื่องจากขนาดของไรในระยะก่อนท้องมีขนาดเล็กจนมองด้วยตาเปล่าแทบไม่เห็น ดังนั้นการระบาดในระยะแรกเริ่มจึงยากแก่การสังเกตเห็นได้ ลักษณะการทำลายของไรไข่ปลาจะเริ่มเห็นได้เมื่อไรตั้งท้องซึ่งจะเห็นเป็นเม็ดกลมๆ ใสคล้ายไข่ปลาขนาดเล็กกว่าไม้ขีดไฟ สำหรับก้อนเชื้อที่ถูกไรทำลายเมื่อนำไปเปิดดอกจะไม่สามารถให้ดอกได้ นอกจากนี้ไรไข่ปลายังสามารถเข้าทำลายเห็ดขอนขาวในระยะดอกตั้งแต่แรกเริ่มจนกระทั่งดอกบานเต็มที่ พบระบาดในช่วงฤดูร้อนและฤดูฝน จากการสำรวจและการศึกษาพบว่าไรไข่ปลาสามารถกินเส้นใยเห็ดขอนขาว เห็ดหูหนู เห็ดกระด้าง เห็ดหลินจือและเห็ดเข็มเงิน แต่ไม่สามารถกินเส้นใยเห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม เห็ดนางรมภูฐาน เห็ดนางรมฮังการี เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดหอมและเห็ดแครง (เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์, 2546)

2.3 แบคทีเรียสำเร็จรูป

จากปัญหาข้อจำกัดในการนำสารชีวภาพกำจัดศัตรูพืช (biopesticides) มาใช้ในสภาวะแปลงปลูกแล้วประสิทธิภาพในการทำลายศัตรูพืชลดลงเมื่อเทียบกับการทดลองในห้องปฏิบัติการ จึงทำให้เกิดการค้นคว้าและพัฒนาแนวทางใหม่สำหรับวิธีการผลิตสารสารชีวภาพกำจัดศัตรูพืช ในปัจจุบันในระดับอุตสาหกรรม คืออุตสาหกรรมผลิตสารกำจัดศัตรูพืชจากเชื้อจุลินทรีย์ (microbial) เพื่อนำมากำจัดและควบคุมการระบาดของสัตว์ศัตรูพืช (animal pest) โรคพืช (plant pathogen) และวัชพืช (weeds) โดยใช้ผสมผสานกับวิธีการอื่นเพื่อลดปัญหามลพิษและอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรการผลิตเชื้อจุลินทรียในปริมาณที่มากพอในเชิงอุตสาหกรรมโดยวิธีการประยุกต์ใช้อุตสาหกรรมการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ ในรูปแบบของการผลิตเชื้อจุลินทรียในอุตสาหกรรม อุตสาหกรรมการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสำเร็จในเชิงการค้า ได้แก่ การผลิตรูปแบบสูตรสำเร็จจากแบคทีเรีย *B. thuringiensis* ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อการผลิตผลึกที่เกิดจากสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย ผลึกที่ผลิตได้จะมีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ในการกำจัดแมลง ซึ่งปัจจุบันมีการผลิตและจำหน่ายอย่างแพร่หลาย (อวบ สารถ้อย, 2540)

2.3.1 ลักษณะแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป

แบคทีเรียที่นำมาผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปควรมีลักษณะดังต่อไปนี้

1) มีความสามารถในการแข่งขันกับจุลินทรีย์หรือเชื้อก่อโรคชนิดอื่นสูง
2) มีความสามารถในการเพิ่มสารเร่งการเจริญของพืช
3) สามารถเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์ได้ง่าย
4) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้กว้าง

5) มีความสามารถในการควบคุมโรคพืชได้ดีและมีความคงตัว

6) ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม

7) สามารถทนต่อความแห้ง ความร้อน สาร oxidizing และรังสียูวีได้

โดยทั่วไปแล้วงานวิจัยส่วนใหญ่จะใช้เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียคลุกกับเมล็ดพืชโดยตรง แม้ว่าแบคทีเรียจะมีประสิทธิภาพที่ดีในการจัดการกับโรคและศัตรูพืชเมื่อทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ แต่กลับพบว่าไม่สามารถใช้เซลล์แขวนลอยได้เมื่อนำไปใช้จริงภายใต้สภาวะแปลงเกษตร ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงวิธีการตรึงเซลล์ของแบคทีเรียให้อยู่ในตัวพาในรูปของสูตรต่างๆ เพื่อง่ายต่อการนำไปประยุกต์ใช้ การเก็บรักษา การค้าและการนำไปใช้จริงในแปลงเกษตร (Nakkeeran et al., 2006)

2.3.2 ส่วนประกอบที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป

ในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปต้องมีส่วนประกอบหรือสารปรุงแต่งอื่นๆ ซึ่งสารปรุงแต่งที่สำคัญๆ มีองค์ประกอบดังต่อไปนี้

1) ตัวทำละลาย (solvent)

2) ตัวพา (carrier)

3) สารยึดเกาะ (binder)

4) สารเพิ่มปริมาณ (filer หรือ diluent)

5) สารลดแรงตึงผิว (surface active agents)

6) สารช่วยแตกกระจายตัว (disintegrant)

7) สารปรุงแต่งอื่นที่ปรุงแต่งเพิ่มเติมเป็นกรณีพิเศษ (special additives)

2.3.2.1 ตัวทำละลาย (solvents)

ตัวทำละลายที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปมีหลายชนิด ซึ่งการเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีคุณภาพดีและเหมาะสมกับจุลินทรีย์จะทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายศัตรูพืชดียิ่งขึ้น โดยหลักเกณฑ์ในการพิจารณาเลือกใช้ตัวทำละลาย มีดังต่อไปนี้

1) มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ได้ดี (solubility of active ingredient)

2) ไม่เป็นพิษต่อใบพืชหรือเซลล์ของพืชทำให้เกิดการไหม้ (phytotoxicity of solvent)

3) ไม่เป็นพิษต่อผู้ใช้และติดไฟง่าย (toxicity and inflammability of the solvent)

4) คุณสมบัติในการระเหยของตัวทำละลาย (volatility of the solvent)

5) ราคาของตัวทำละลาย (cost of the solvent)

คุณสมบัติที่สำคัญของตัวทำละลายคือการรวมตัวกับน้ำซึ่งใช้เป็นตัวเจือจาง ในทางปฏิบัติตัวทำละลายแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่ไม่รวมตัวกับน้ำเช่น ตัวทำละลายพวกน้ำมันไซลีน (xylene) การที่จะให้น้ำมันไซลีนที่เป็นตัวทำละลายรวมตัวกับน้ำได้นั้นการปรุงแต่งจะต้องใส่หรือผสมสารเสริมประสิทธิภาพอีมัลซิฟายด์เออร์ (emulsifier) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้น้ำมันตัวทำละลายเข้ากับน้ำที่เป็นตัวเจือจางได้ สารที่ปรุงแต่งแล้วจะปรุงแต่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่อยู่ในรูปของน้ำมันละลายน้ำ (Emulsifiable concentration, E.C.) และกลุ่มที่สามารถรวมตัวกับน้ำได้ดีได้แก่ ตัวทำละลาย ไอโซโปรปานอล (isopropanol) และไกลโคลอีเทอร์ (glycolethers) การปรุงแต่งเมื่อปรุงแต่งเสร็จแล้วจะอยู่ในรูปของเหลวข้นละลายน้ำ (soluble concentration)

2.3.2.2 ตัวพาหรือกลางในการยึดเกาะ (carrier)

ตัวพาใช้เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปของแข็ง เช่น รูปแบบผงหรือแบบเม็ด ในทางการค้าการประยุกต์ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืชจะต้องมีการพัฒนาสูตร ซึ่งตัวพามีความสำคัญมากในการรอดชีวิตของแบคทีเรีย โดยตัวพาจะเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียโดยการปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากสภาวะแวดล้อมภายนอก อายุการเก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย ชนิดของตัวกลาง และขนาดอนุภาคของตัวกลาง โดยทั่วไปสารพามีลักษณะเป็นสารเฉื่อย และทำหน้าที่เป็นตัวพาเชื้อจุลินทรีย์ให้กระจายตัวอย่างทั่วถึง เมื่อนำรูปแบบสูตรสำเร็จไปใช้งาน สารพาที่เป็นสารอินทรีย์จะมีปริมาณลิกนินเป็นส่วนประกอบอยู่สูงซึ่งช่วยยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิด และยังใช้เป็นแหล่งอาหารที่ดีของจุลินทรีย์ ตัวอย่างของตัวกลางที่ใช้ในการผลิตรูปแบบสูตรสำเร็จจากแบคทีเรีย ซึ่งตัวกลางส่วนใหญ่จะมีทั้งสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ ที่มีราคาถูกและง่ายต่อการนำไปใช้งาน สารอินทรีย์ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในการผลิตสูตรสำเร็จรูปยกตัวอย่าง เช่น กากถั่วเหลือง (soybean meal) ซังข้าวโพด (corn cob) รำข้าวสาลี (wheat bran) พีต (peat) ทัลคัม (talcum) ลิกไนต์ (lignite) ดินขาว (kaolinite) ไพโรฟิลไรท์ (pyrophyllite) ซีโอไลต์ (zeolite) แร่มอนต์มอริลโลไนต์ (montmorillonite) แอลจิเนต (alginate) ขี้เลื่อย (sawdust) และ เวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) เป็นต้น

2.3.2.3 สารยึดเกาะ (binder)

สารยึดเกาะมีคุณสมบัติทำให้สารประกอบในรูปแบบสูตรสำเร็จเกาะกันได้ดี กรณีของแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบเม็ดทำให้เกิดการเกาะกันเป็นเม็ดที่แข็งขึ้น มีขนาดตามต้องการ มีความสม่ำเสมอ สารยึดเกาะมีหลายชนิดทั้งที่เป็นน้ำตาลและสารประกอบเชิงซ้อนจากธรรมชาติ เช่น แป้ง (starch) น้ำตาลซูโครส (sucrose) และเจลาติน (gelatin) รวมถึงสารที่ได้จากการ

สังเคราะห์ เช่น เมทิลเซลลูโลส (methyl cellulose) และ โพลีไวนิลไพโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone; PVP) เป็นต้น

2.3.2.4 สารเพิ่มปริมาณ (filler หรือ diluent)

คุณสมบัติที่ดีของสารเพิ่มปริมาณ คือ ไม่ดูดความชื้น มีการไหลที่ดี และทำให้แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบเม็ดมีความแข็งและเหมาะสม มีการแตกตัวได้ดี เช่น น้ำตาลแลกโตส (lactose) น้ำตาลซูโครส (sucrose) แป้ง (starch) แคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) แมนนิทอล (mannitol) แคลเซียมซัลเฟต (calcium sulfate) ไดแคลเซียมฟอตเฟต (dibasic calcium phosphate) สาร microcrystalline cellulose และน้ำตาลซอร์บิทอล (sorbitol) เป็นต้น

2.3.2.5 สารลดแรงตึงผิว (surface active agents)

สารลดแรงตึงผิวหรือสารเสริมประสิทธิภาพในการจับใบ (surfactant) สารที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ได้แก่ สบู่ ผงซักฟอก น้ำมันพืช และสารอื่นๆ ที่ทำให้น้ำมันรวมตัวเข้ากับน้ำได้ เช่นสาร อีมัลซิฟายเออร์ (emulsifier) สารที่ช่วยในการเปียกหรือสารทำให้เปียกง่าย (wetting agents) สารที่ทำให้มีการกระจายตัวได้ดี (dispersing agents) สารที่ช่วยทำให้เกิดฟอง (foaming agent) และสารที่ช่วยทำให้เกิดการแพร่ขยายตัวได้ดีบนพื้นผิวที่สัมผัส (spreading agents) สารลดแรงตึงผิวมีคุณสมบัติพิเศษเฉพาะ คือโมเลกุลของสารรับกันเป็นลูกโซ่ (chain like molecule) ในแต่ละโมเลกุลของสารมีแขนของโมเลกุลข้างหนึ่งที่มีความสามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้ (hydrophillic) และอีกข้างหนึ่งจะตรงกันข้าม (hydrophobic) แต่สามารถจับกับโมเลกุลน้ำมันที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดี นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวยังทำให้ละอองน้ำของรูปแบบแบคทีเรียที่พ่นออกมาจากหัวฉีดมีขนาดละอองน้ำสม่ำเสมอ ช่วยลดการสูญเสียน้ำยาที่ไหลลงสู่พื้นดิน ทำให้ละอองน้ำยาเปียกใบและทรงพุ่มของต้นพืชอย่างทั่วถึง ประหยัดน้ำยาและแรงงานพ่น และยังช่วยในการกระจายตัวของสารด้วย

แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบสารแขวนลอยและแบบผงนั้นจะใส่สารลดแรงตึงผิว เพราะโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวซึ่งมีแขนหรือโมเลกุลที่เกาะกับน้ำไม่ได้ (hydrophobic tails) จะจับติดกับส่วนที่เป็นพื้นผิวของผงฝุ่น ส่วนขั้วหรือแขนข้างหนึ่งที่เข้ากับน้ำหรือเกาะติดกับโมเลกุลของน้ำได้ (hydrophilic head) ก็จะจับกับโมเลกุลของน้ำทำให้ผงฝุ่นกระจายตัวเจือจางอย่างสม่ำเสมอ และทั่วถึงคุณสมบัติดังกล่าวจะทำให้ผงฝุ่นไม่ตกตะกอนหรือถ้าตกตะกอนก็ตกตะกอนนอนก้นถังช้าลง ทำให้การฉีดพ่นมีประสิทธิภาพในการป้องกันดีขึ้น

2.3.2.6 สารช่วยแตกกระจายตัว (disintegrant)

เป็นสารที่ช่วยให้แบคทีเรียสำเร็จรูปมีการแตกตัวหรือกระจายตัวได้ในเวลาอันเหมาะสม เช่น รูปแบบเม็ดเมื่อสัมผัสน้ำหรือสารละลาย เช่น แป้ง (starch) เป็นสารจาก

ธรรมชาติ เช่น แป้งข้าวโพด (corn starch) แป้งข้าวสาลี (wheat starch) หรือแป้งมันฝรั่ง (potao starch) โดยทั่วไปหากมีปริมาณแป้งในแบคทีเรียสำเร็จรูปในปริมาณมากจะทำให้เกิดการแตกตัวที่เร็วขึ้นแต่อาจทำให้เกิดปัญหา คือการเกาะตัวกันและความแข็งของรูปแบบเม็ดลดลง

2.3.2.7 สารปรุงแต่งอื่นที่ปรุงแต่งเพิ่มเติมเป็นกรณีพิเศษ (special additives)

(1) สารช่วยในการซึมเปียก (wetters)

ในธรรมชาติตามผิวใบของใบพืชจะมีไขมันเคลือบเพื่อป้องกันการระเหยหรือคายน้ำออกจากใบ การมีไขมันเคลือบดังกล่าว ทำให้ละอองน้ำยาที่พ่นออกจากหัวฉีดไปบนใบพืชจับหรือเกาะติดบนใบได้ยาก ดังนั้นการที่จะช่วยทำให้ใบเปียกหรือเกาะติดกับละอองน้ำยาได้ง่ายจึงจำเป็นต้องใส่สารช่วยในการซึมเปียก เช่น สารซักฟอก (detergent)

(2) น้ำมันพืช (plant oils)

น้ำมันเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยา อาจปรุงแต่งหรือมีจำหน่ายในรูปของอิมัลซิฟายเออร์ มีประโยชน์ในการป้องกันการระเหย ทำให้มีการซึมเปียกได้ดี ทำให้มีการแตกตัวและการรวมตัวกับน้ำได้ในระดับโมเลกุลและช่วยลดการชะล้างของสารออกจากใบพืชในขณะที่ฝนตกแต่ถ้ามีการใช้ในปริมาณที่มากเกินไปอาจเป็นพิษหรือเป็นอันตรายต่อพืชได้ ทั้งนี้แล้วแต่ชนิดของน้ำมันและสภาพดินฟ้าอากาศ

(3) สารช่วยลดการเกิดฟองในน้ำยาผสม (defoamers)

การใช้เครื่องพ่นคุณภาพต่ำราคาถูกอาจเป็นสาเหตุของการเกิดฟองออกจากหัวฉีด หรือใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสมความเข้มข้นมากเกินไปอาจทำให้เกิดฟองในถังผสมได้ การเกิดฟองมากมีผลเสียทำให้การกระจายตัวออกจากหัวฉีดไม่เป็นฝอย ขนาดของละอองน้ำยาโตไม่สม่ำเสมอทำให้การคลุมพื้นที่ไม่ทั่วถึง ละอองน้ำยาที่มีขนาดใหญ่ทำให้การไหลออกจากใบพืชสู่พื้นดินมีมาก ดังนั้นการใช้สารป้องกันการเกิดฟอง จึงมีความจำเป็น ซึ่งที่นิยมใช้คือ สารซิลิโคน (silicone)

(4) สารเพิ่มความหนืด (thickeners)

สารเพิ่มความหนืดปกติจะมีการใช้กันน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับสารตัวอื่นๆ ใส่เพื่อเพิ่มความหนืด (viscosity) ของละอองน้ำยาเพิ่มความหนักของละอองน้ำยาอันเป็นสาเหตุอาจปลิวไปกับกระแสลม การหักเหออกจากพื้นที่เป้าหมายที่ต้องการฉีดพ่น นอกจากนี้ความหนืดยังช่วยยับยั้งการไหล และการสูญเสียของละอองน้ำยาซึ่งไหลตกลงสู่พื้นดินด้วยการชะล้างของเม็ดฝนที่ตกลงมากระทบกับใบพืช (วานิด รอดเนียม, 2552; อวบ สารถ้อย, 2540)

การผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปแต่ละชนิดส่วนผสมหลักในการผลิตประกอบด้วยส่วนผสมทั้ง 7 ชนิด ซึ่งปริมาณการใช้ขึ้นอยู่กับรูปแบบของสูตรสำเร็จ ชนิดของแบคทีเรีย

การนำไปใช้เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งแสดงถึงตัวอย่างส่วนผสมในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *Bacillus* sp.

ตารางที่ 1 องค์ประกอบและตัวอย่างสารผสมในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *Bacillus* sp.

ส่วนประกอบ	**ตัวอย่างสารผสม**
Liquid carriers	Vegetable oils
Mineral carriers	Kaolinite clay, diatomaceous earth
Organic carriers	Grain flours
Stabilizers	Lactose, sodium benzoate
Nutrients	Molasses, peptone
Binders	Gum arabic, carboxy methyl cellulose
Desiccants	Silica gel, anhydrous salts
Thickeners	Xanthan gum
Surfactants	Tween 80
Dispersants	Microcrystalline cellulose
UV protectants	
-Sunscreens	Oxybenzone
-Optical brighteners	Blankophor BBH
-Light blockers	Lignin (PC 1307)
Stickers	Pregelatinized corn flour

ที่มา : Schisler, Slininger, Behle and Jackson (2004)

2.3.3 รูปแบบของแบคทีเรียสำเร็จรูป

เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ใช้ในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืช สามารถแบ่งออกเป็น 2 สูตร คือ สูตรน้ำและสูตรผงแห้ง (สูตรของแข็ง)

2.3.3.1 สูตรน้ำ ประกอบด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบ water-based, oli-based, polymer-based หรือผสมทุกส่วนร่วมกัน สูตร water-based ได้แก่ suspension concentrate, suspo-emulsions และ capsule suspension เป็นต้น จะต้องมีการผสมส่วนประกอบเพิ่ม เช่น สารเพิ่มความคงตัว (stabilizers) สารลดแรงตึงผิว (surfactants) สารให้สี

(coloring agents) สารป้องกันการเยือกแข็ง (antifreeze compounds) และ สารอาหารอื่นๆ (additional nutrients)

2.3.3.2 สูตรผงแห้ง สามารถผลิตได้จากการใช้เทคโนโลยีต่างๆ กัน เช่น spray drying freeze drying หรือ air drying ที่มีหรือไม่มี fluidized bed ซึ่งสามารถผลิตได้โดยการเติมสารยึดเกาะกระจายตัว (binder dispersant) และ สารเปียกใบ (wetting agents) เป็นต้น ซึ่งสูตรแต่ละชนิดมีวิธีการผลิตที่จำเพาะ

รูปแบบของแบคทีเรียสำเร็จรูปชนิดต่างๆ มีลักษณะสำคัญ ดังนี้

1) รูปแบบผงฝุ่น (dusts, DP) ผลิตจากการนำสารออกฤทธิ์มาทำให้อยู่ในรูปผงบดละเอียด ผงแร่ของแข็ง (เช่น ผง และดินเหนียว เป็นต้น) โดยให้มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 50-100 ไมโครเมตร สูตรผงฝุ่นนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้โดยตรง ซึ่งสารประกอบเพิ่มเติมของสูตรนี้เป็นสารป้องกันการแข็งตัว (anticaking agents) สารป้องกันรังสียูวี และสารยึดเกาะเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับ โดยทั่วไปสารประกอบออกฤทธิ์สำคัญของสูตรผงฝุ่นมีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าสูตรนี้มีข้อดีหลายประการแต่ยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับอันตรายจากผงฝุ่นกระจายต่อตัวผู้ใช้ สูตรผงฝุ่นนี้เป็นสูตรที่ใช้มาเป็นระยะเวลานานแล้วก่อนที่จะพัฒนาเป็นสูตรแกรนูล ซึ่งสูตรผงฝุ่นชนิดอื่นมีวิธีการผลิตที่ง่ายและยังมีการใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

2) รูปแบบผงคลุกเมล็ด (powders for seed treatment, DS) ผลิตจากการผสมสารออกฤทธิ์กับผงตัวพาเพื่อให้ยึดเกาะกับเปลือกหุ้มเมล็ดได้ โดยสูตรนี้สามารถนำไปใช้คลุกผสมกับเมล็ดพืชซึ่งสูตรนี้มีการผสมตัวพาช่วยการยึดเกาะด้วย สูตรผงคลุกเมล็ดนี้เป็นสูตรที่มีการนำมาใช้นานแล้วโดยจะใช้ในรูปการเคลือบเมล็ด

3) รูปแบบแกรนูล (granules, GR) คล้ายกับสูตรผงฝุ่นแต่สูตรแกรนูลจะมีอนุภาคที่ใหญ่กว่าและน้ำหนักมากกว่า โดยอนุภาคหยาบ มีขนาด 100-1,000 ไมโครเมตร และอนุภาคเล็กละเอียดมีขนาด 100-600 ไมโครเมตร ซึ่งจะผลิตจากแร่ชนิดต่างๆ เช่น ดินขาว (kaolinite) ซิลิกา (silica) แป้ง (starch) โพลีเมอร์ (polymers) dry fertilizers และเศษพืชบดละเอียด โดยทั่วไปสารประกอบออกฤทธิ์สำคัญของสูตรแกรนูลมีความเข้มข้น ในช่วง 5-20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารออกฤทธิ์จะถูกห่อหุ้มไว้ภายในเม็ด โดยสูตรแกรนูลมีวิธีการผลิตที่ง่ายซึ่งทำการผสมสารออกฤทธิ์ในรูปผงผสมน้ำเล็กน้อยให้อยู่ในรูปผงชุ่มน้ำ (paste) ซึ่งลำดับต่อมาจะอัดให้อยู่ในรูปแห้ง นอกจากนี้สามารถนำสารออกฤทธิ์ที่เป็นของเหลวผสมกับตัวดูดซับที่มีอนุภาคหยาบได้ เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ในสูตรแกรนูลแล้วสามารถเคลือบแกรนูลได้ด้วยเรซินหรือโพลีเมอร์เพื่อควบคุมอัตราประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ชีวภาพหลังการนำไปใช้ได้ สารฆ่าแมลงชีวภาพแกรนูลจะนำมาใช้โดยตรงกับดินเพื่อป้องกันวัชพืช ไส้เดือนศัตรูพืช และแมลงศัตรูพืชที่อาศัยในดินหรือเพื่อให้พืช

ดูดซึมทางราก ในการใช้สูตรแกรนูล 1 ครั้ง แกรนูลจะปลดปล่อยสารออกฤทธิ์อย่างช้าๆ สูตรแกรนูลบางชนิดต้องการดินที่มีความชื้นที่เหมาะสมเพื่อปลดปล่อยสารออกฤทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพ

4) รูปแบบผงละลายน้ำ (wettable powders, WP) เป็นสูตรที่แห้งอนุภาคบดละเอียดสามารถนำมาใช้ได้หลังการละลายในน้ำ สูตรผงละลายน้ำสามารถผลิตได้จากการบดผสมสารออกฤทธิ์กับสารลดแรงตึงผิว สารเปียกใบ (wetting agent) และ สารเพิ่มการกระจายตัว (dispersing agent) พร้อมองค์ประกอบอื่นๆ จากนั้นทำการบดให้ละเอียดเพื่อให้ได้ขนาดอนุภาคตามต้องการ (ประมาณ 5 ไมโครเมตร) สูตรผงละลายน้ำนี้ก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพผู้ใช้และความปลอดภัยของกระบวนการผลิตเนื่องจากการกระจายของผงฝุ่น ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ ระคายเคืองผิวหนังและดวงตาได้หากไม่มีการป้องกันและระมัดระวังก่อนการใช้ จากปัญหาการเกิดผงฝุ่นกระจายของสูตรนี้จึงมีการพัฒนาในรูปแบบของสารแขวนลอยเข้มข้นและสูตรแกรนูลละลายน้ำซึ่งปัจจุบันมีการผลิตสารฆ่าแมลงชีวภาพในรูปแบบดังกล่าวอย่างแพร่หลาย หากพิจารณาสูตรสารฆ่าแมลงชีวภาพแบบแข็งส่วนใหญ่จะมุ่งที่สูตรผงละลายน้ำ (WP) เนื่องจากมีความคงตัวในการเก็บรักษา ผสมกับน้ำได้ง่ายและสะดวกต่อการนำไปใช้โดยการใช้เครื่องพ่นต่างๆ

5) รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ (water dispersible granules, WG) สูตรแกรนูลละลายน้ำนี้พัฒนามาเพื่อแก้ไขปัญหาการกระจายตัวของผงฝุ่นของสูตรผง ซึ่งสูตรแกรนูลละลายน้ำนี้ออกแบบมาให้ละลายในน้ำก่อนการนำไปใช้ เช่น แกรนูลที่ละลายน้ำอยู่ในรูปเซลล์แขวนลอยเหมือนกันกับสูตรผงละลายน้ำ เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรผงอื่นๆ พบว่าสูตร WG มีการกระจายของผงฝุ่นต่ำและมีความคงตัวในการเก็บรักษา การผลิตสูตรแกรนูลละลายน้ำสามารถผลิตด้วยกระบวนการต่างๆ เช่น extrusion granulation, fluid bed granulation และ spray drying เป็นต้น ในสูตรนี้จะประกอบด้วย สารเปียกใบ (wetting agent) และ สารเพิ่มการกระจายตัว (dispersing agent) เช่นเดียวกับสูตรผงละลายน้ำแต่จะใช้สารเพิ่มการกระจายตัว (dispersing agent) ที่ความเข้มข้นสูงกว่า สูตรแกรนูลละลายน้ำมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าสูตรเดิม (สูตรผงฝุ่นและสูตรผงละลายน้ำ) แต่มีความปลอดภัยและวิธีการใช้ที่ง่ายและดีกว่า

6) รูปแบบอิมัลชั่น (emulsion) ประกอบด้วยของเหลวที่ละลายในของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ผสมตัวกัน (ขนาดของหยดของเหลวที่กระจายมีขนาด 0.1-10 ไมโครเมตร) โดยสูตรอิมัลชั่นเป็นน้ำมันละลายในน้ำ (EW) ซึ่งเป็นอิมัลชั่นทั่วไป หรือน้ำในน้ำมัน (EO) ซึ่งผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 รูปแบบนี้จะออกแบบมาให้สามารถผสมกับน้ำก่อนการนำไปใช้ เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาความไม่คงตัวของสูตรอิมัลชั่นทำได้โดยการเลือกใช้อิมัลซิฟายเออร์ (emulsifiers) ที่เหมาะสมเพื่อความคงตัวของสูตร อย่างไรก็ตามความคงตัวที่ต่ำและการเกิดความเป็นพิษต่อพืชในบางครั้งเป็นผลกระทบจากประสิทธิภาพของอิมัลชั่น ซึ่งมีการศึกษาถึงการเลือกใช้น้ำมันและ

อิมัลซิฟายเออร์ (emulsifiers) ที่เหมาะสมเพื่อปรับปรุงสูตรสารฆ่าแมลงชีวภาพแบบอิมัลชั่นให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

7) รูปแบบสารแขวนลอยเข้มข้น (suspension concentrate, SC) สูตรสารแขวนลอยเข้มข้นเป็นสูตรที่เป็นสารผสมที่มีอนุภาคละเอียดโดยสารออกฤทธิ์ของแข็งจะละลายในส่วนของเหลวซึ่งส่วนใหญ่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายซึ่งต้องใช้การกวนช่วยในการละลายก่อนการนำไปใช้ องค์ประกอบของสารแขวนลอยเข้มข้นประกอบด้วยสารเปียกใบ (wetting agent) สารเพิ่มการกระจายตัว (dispersing agent) สารเพิ่มความแข็งตัว (thickening agents) และสารป้องกันการลอยตัว (antifoaming agents) เป็นต้น เพื่อความคงตัวของสารออกฤทธิ์ สามารถผลิตได้โดยกระบวนการบดแบบเปียกซึ่งทำให้ได้อนุภาคอยู่ในช่วง 1-10 ไมโครเมตร ในระหว่างกระบวนการบดตัวอย่างสารประกอบอื่นๆ จะถูกดูดซับเข้าไปในพื้นผิวอนุภาคเพื่อป้องกันการเกาะกลุ่มของอนุภาคขนาดเล็กได้ โดยอนุภาคขนาดเล็กนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพทางชีวภาพได้ดีเนื่องจากมีผลทำให้พื้นผิวอนุภาคสารออกฤทธิ์ซึมผ่านไปยังเนื้อเยื่อพืชได้ดี สูตรสารแขวนลอยเข้มข้นเป็นสูตรน้ำข้อดีหลายประการ เช่น ละลายและตวงปริมาตรง่ายและมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นสูตรนี้จึงเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย

8) รูปแบบละลายในน้ำมัน (oil dispersions, OD) เป็นสูตรที่สารประกอบออกฤทธิ์ในรูปของแข็งไม่ละลายน้ำ โดยของเหลวที่ใช้ละลายจึงเป็นน้ำมัน น้ำมันที่เหมาะสมที่สุดคือน้ำมันจากพืช ซึ่งสามารถกระจายตัวและแทรกซึมในตัวอย่างพืชได้ดี ลักษณะสำคัญหลายประการของสูตรละลายในน้ำมัน เช่น ความสามารถในการขนส่งสารออกฤทธิ์ที่ไวต่อน้ำและความสามารถของสารตัวช่วยที่ใช้แทนน้ำที่สูงขึ้นและใช้ควบคุมศัตรูพืชได้กว้าง โดยสูตรนี้มีวิธีการผลิตเช่นเดียวกันกับสูตรสารแขวนลอยเข้มข้น โดยส่วนประกอบอื่นของสูตรนี้จะต้องเลือกใช้อย่างระมัดระวังเพื่อป้องกันปัญหาความไม่คงตัว

9) รูปแบบ suspo-emulsions (SE) คือ สารผสมระหว่างสารแขวนลอยเข้มข้นและอิมัลชั่น ซึ่งผลิตภัณฑ์นี้เป็นที่ต้องการและนิยมผลิตเป็นสูตรมากเนื่องจากสามารถพัฒนาให้เป็นอิมัลชั่นเนื้อเดียวกันผสมกับอนุภาคแขวนลอยได้ โดยยังคงความคงตัวของสูตรไว้ได้ ซึ่งการผลิตสารฆ่าแมลงชีวภาพสูตรนี้จะต้องเลือกใช้สารเพิ่มการกระจายตัว (dispersing agent) และสารอิมัลซิฟายเออร์ (emulsifying agents) ที่เหมาะสมเพื่อป้องกันปัญหาการเกิด heteroflocculation ระหว่างอนุภาคของแข็งและหยดน้ำมัน นอกจากนี้การทดสอบความคงตัวของสูตรดังกล่าวก็มีความจำเป็นอย่างมาก

10) รูปแบบแคปซูลแขวนลอย (capsule suspension, CS) เป็นสารแขวนลอยสารออกฤทธิ์จากจุลินทรีย์ที่ห่อหุ้มด้วยแคปซูลที่มีความคงตัว ต้องเจือจางน้ำก่อนใช้ โดยสาร bio-agent คือ สารออกฤทธิ์ที่ห่อหุ้มในแคปซูลที่ผลิตจากเจลาติน แป้ง เซลลูโลสและ

โพลีเมอร์อื่นๆ ซึ่งสาร bio-agent นี้ช่วยป้องกันสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น รังสียูวี น้ำฝน อุณหภูมิ เป็นต้น และช่วยปรับปรุงการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ให้มีความคงตัวอย่างช้าๆ การห่ออุ้มเซลล์แบคทีเรียด้วยแคปซูล (encapsulation) ในรูปแคปซูลขนาดเล็กจะใช้ในสูตรสารฆ่าแมลงชีวภาพจาก เชื้อราซึ่งมีขนาดอนุภาคที่เล็กและมีประสิทธิภาพที่สูง สารแขวนลอยแคปซูลขนาดเล็ก (microcapsule) ที่มีความคงตัวจะต้องผสมกับสารลดแรงตึงผิวและสารเพิ่มความหนืด (thickeners) เช่นเดียวกับสูตรสารแขวนลอยเข้มข้น จากคุณสมบัติสูตรแขวนลอยแคปซูลที่มีการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์แบบช้าเป็นผลให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตสูง

11) รูปแบบ ultra low volume liquids (UL) เป็นสูตรที่ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ที่มีความเข้มข้นสูง ละลายตัวได้ดีในของเหลว โดยสูตรนี้ไม่ต้องละลายน้ำก่อนการนำไปใช้ และมักประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิว (surface active agents) และสารควบคุมการลอยตัว (antifoaming agent) สูตรนี้สะดวกต่อการขนส่งและการนำไปใช้ โดยสูตร ultra low volume liquids นี้มีวิธีการผลิตที่คล้ายกันกับการผลิตสารควบคุมโดยชีววิธีแบบแขวนลอย (Gasic and Tanovic, 2013)

2.3.4 ลักษณะแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ดี

แบคทีเรียสำเร็จรูปที่ดีควรมีลักษณะดังต่อไปนี้ (Nakkeeran et al., 2006; นิพนธ์ ทวีชัย, 2538)

1) มีมาตรฐานที่เชื่อถือได้ คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปต้องมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียใกล้เคียงได้มาตรฐานทุกๆ ครั้งที่ผลิต ไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน และคุณภาพการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชสม่ำเสมอ

2) ควรมีอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียสูงหรืออายุการเก็บรักษานาน โดยเฉพาะในประเทศไทยซึ่งมีอากาศร้อน ไม่ต้องดูแลรักษามาก

3) ไม่เป็นพิษต่อพืชผลทางการเกษตร และมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่น และเกิดการเปลี่ยนแปลเสียหายต่อสิ่งแวดล้อมต่างๆ

4) มีการใช้ร่วมกันสามารถใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆ ได้ แล้วทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดียิ่งขึ้น ประหยัดค่าใช้จ่ายและสะดวกต่อการนำมาใช้

5) มีความสามารถในการละลายน้ำและปลดปล่อยแบคทีเรียได้ดี

6) ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงได้

7) ตัวพาที่ใช้ควรมีราคาถูกและง่ายต่อการนำไปใช้งาน

2.3.5 ตัวอย่างแบคทีเรียสำเร็จรูป

จากข้อจำกัดของแบคทีเรียที่ก่อโรคในแมลงในรูปแบบเซลล์แขวนลอยสดมีความคงตัวต่ำ ไม่สะดวกต่อการนำไปใช้ เก็บรักษาได้ยากและระยะเวลาในการเก็บรักษาสั้น ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชลดลงด้วย จึงมีการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบต่างๆ ขึ้น และมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชของ biocontrol agent ชนิดต่างๆ ทั้งยังเป็นการปรับปรุงคุณภาพของชีวภัณฑ์ด้วย ซึ่งในปัจจุบันมีแบคทีเรียสูตรสำเร็จที่ผลิตและจำหน่ายทางการค้าในปัจจุบัน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างแบคทีเรียสำเร็จรูปที่จำหน่ายทางการค้า

ชื่อผลิตภัณฑ์	สายพันธุ์แบคทีเรีย	รูปแบบสูตรสำเร็จ	เป้าหมายควบคุม
Dipel, Futura	*B. thuringeinsis* var. *kurstaki (Btk)*	Dry flowable	หนอนผีเสื้อชนิดต่างๆ
Bactimos, LarvX	*B. thuringeinsis* var. *israelensis (Bt)*	Wettable powder	ลูกน้ำยุง หนอนแมลงวัน
M-One	*B. thuringeinsis* var. *tenebrinos*	Wettable powder	ตัวอ่อนด้วงงวงมันเทศ
Certan	*B. thuringeinsis* var. *aizawai*	Wettable powder	หนอนกินรังผึ้ง
Serenade	*B. subtilis* QST 713	Wettable powder, Aqueous suspension	เชื้อรา แบคทีเรียก่อโรคในผักผลไม้
EcoGuard	*B.licheniformis* SB3086	Flowable	*Sclerotinia homoeocarpa* ในสนามหญ้า

ตารางที่ 2 ตัวอย่างแบคทีเรียสำเร็จรูปที่จำหน่ายทางการค้า (ต่อ)

ชื่อผลิตภัณฑ์	สายพันธุ์แบคทีเรีย	รูปแบบสูตรสำเร็จ	เป้าหมายควบคุม
Kodiak	*B. subtilis*	Wettable powder, Flowable	เชื้อราในฝ้าย พืชตระกูลถั่วและถั่วเหลือง
Yield Shield	*B. pumillus* GB34	Wettable powder	เชื้อราในถั่วเหลือง
Subtilex Hi	*B. subtilis* MBI600	Wettable powder	เชื้อราในฝ้าย พืชตระกูลถั่วและถั่วเหลือง

ที่มา : Schisler et al. (2004); Usta (2013)

2.3.6 ข้อดีและข้อจำกัดของการใช้แบคทีเรียสำเร็จรูปในการควบคุมศัตรูพืช

ข้อดีของการใช้แบคทีเรียสำเร็จรูป

1) มีความเป็นพิษจำเพาะเจาะจงต่อแมลงเป้าหมายสูง

2) ไม่มีความเป็นพิษและไม่ก่อให้เกิดโรคต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ไม่ใช่แมลงเป้าหมาย เช่น มนุษย์ สัตว์ป่าชนิดอื่นๆ และศัตรูธรรมชาติที่มีประโยชน์ เป็นต้น

3) สามารถนำมาใช้ร่วมกับสารเคมีกำจัดแมลงหรือวิธีการควบคุมแมลงอื่นๆ ได้โดยไม่ขัดขวางการออกฤทธิ์ของสารสำคัญต่อกัน

4) สารฆ่าแมลงจากจุลินทรีย์มาใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้ตลอดฤดูกาลเพาะปลูก

5) จุลินทรีย์ก่อโรคในแมลงสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนในซากแมลงเป้าหมายได้

6) สารฆ่าแมลงจากจุลินทรีย์บางชนิดสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้จึงทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น

ข้อจำกัดของการใช้แบคทีเรียสำเร็จรูป

1) เนื่องจากสารฆ่าแมลงจากจุลินทรีย์มีความเป็นพิษจำเพาะเจาะจงต่อแมลงเป้าหมายสูง จึงทำให้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้บางชนิดเท่านั้น ส่งผลให้พืชถูกแมลงนอกเป้าหมายชนิดอื่นทำลายได้

2) สารฆ่าแมลงจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะไม่ทนต่อแสงยูวี สภาวะอากาศร้อนแห้งแล้ง และอุณหภูมิสูง จึงทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายแมลงลดลงได้

3) สารฆ่าแมลงจากจุลินทรีย์บางชนิดมีขั้นตอนวิธีการผลิตและการเก็บรักษาที่จำเพาะซึ่งอาจทำให้เกิดความยุ่งยากในการใช้

4) สารฆ่าแมลงจากจุลินทรีย์มีการนำไปใช้และจำหน่ายทางการค้าอย่างจำกัด เนื่องจากมีความเป็นพิษจำเพาะเจาะจงต่อแมลงเป้าหมายเท่านั้น รวมถึงค่าใช้จ่ายที่สูงในการผลิต (Usta, 2013)

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หริพันธุ์ สมนิล, ทัศนุพันธุ์ กุศลสถิตย์ และปัณณวิชญ์ เย็นจิตต์ (2560) ศึกษาประสิทธิภาพแบคทีเรียสำเร็จรูป *Bacillus* spp. รูปแบบผงละลายน้ำ (wettable powder, WP) ในการควบคุมโรคราดำ *Aspergillus niger* ในเห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél.) พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 2 ร่วมกับสายพันธุ์ 3 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราดำได้สูงสุด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคราดำที่ต่ำเท่ากับ 24.98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม (24.84 เปอร์เซ็นต์) และทำให้ได้ผลผลิต (595.35 กรัมต่อถุง) สูงกว่าการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม (488.96 กรัมต่อถุง) เมื่อทำการเพิ่มจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 2 ในน้ำนมวัวยูเอชที (ultra high temperature, UHT) และน้ำมะพร้าวเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม โดยเฉพาะแบคทีเรียสำเร็จรูป *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 2 ที่เพิ่มจำนวนในน้ำนมวัวยูเอชที พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคราดำเพียง 17.23 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลผลิตเห็ดสูงสุดที่ 732.51 กรัมต่อถุง ในขณะที่การใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคราดำที่ 19.75 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลผลิตเห็ดต่ำกว่าที่ 612.95 กรัมต่อถุง

Abd El-Kareem et al. (2010) ศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera littoralis* (Fabricius) ของแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) รูปแบบผงละลายน้ำ (wettable powder, WP) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (LC_{25}, LC_{50} และ LC_{90}) พบว่าระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียสำเร็จรูป Btk สูงขึ้น ประสิทธิภาพในการทำลายหนอนกระทู้ผักวัย 2 และวัย 4 จะเพิ่มขึ้นด้วย โดยที่ระดับความเข้มข้น LC_{90} มีค่าเท่ากับ 0.418 และ 1.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถควบคุมหนอนกระทู้ผักวัย 2 และวัย 4 ได้สูงสุด 85 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Ardakani et al. (2010) ทำการศึกษาการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงละลายน้ำจากแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* โดยใช้สารตัวพาต่างชนิดกันในการควบคุมเชื้อรา *Rizoctonia solani* สาเหตุโรคเน่าคอดิน (dumping-off) ในฝ้ายโดยวิธีการคลุกเมล็ด พบว่ารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงละลายน้ำที่ใช้สารตัวพาชนิดผงทัลคัม (talcum) เบนโทไนต์

(bentonite) และรำข้าว (rice bran) มีความคงตัวในการทำลายเชื้อราก่อโรคที่ดี และเมื่อทดสอบในสภาวะเรือนทดลองพบว่า สามารถควบคุมเชื้อราได้สูงกว่า 62.50 เปอร์เซ็นต์

Arthurs, Lacey and De La Rosa (2008) ศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนเจาะมันฝรั่ง *Phthorimaea operculella* (Zeller) ของแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Berliner) (Btk) รูปแบบผงละลายน้ำภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป Btk รูปแบบ WP ความเข้มข้น 150 mg Btk WP/kg tuber สามารถควบคุมหนอนเจาะมันฝรั่งได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และต้องใช้แบคทีเรียสำเร็จรูป Btk ในความเข้มข้นที่สูงขึ้นเมื่อหนอนเจาะมันฝรั่งมีการพัฒนาตัว นอกจากนี้แบคทีเรียสำเร็จรูป Btk ยังสามารถควบคุมหนอนเจาะมันฝรั่งที่มีการแพร่ระบาดทำลายมันฝรั่งในโรงเก็บแล้ว 10 เปอร์เซ็นต์ ให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจได้

Chakravarty and Kalita (2011) ทำการศึกษาการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงละลายน้ำจากแบคทีเรีย *P. fluorescens* โดยใช้สารตัวพาและสารยึดเกาะต่างชนิดกันในการควบคุมแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเน่าในมะเขือยาว พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป CVPf ที่ใช้ตัวพาปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน (vermicompost) และสารเกาะติดโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตสูงสุด 8.90×10^{10} โคโลนีต่อกรัม และ 4.50×10^{7} โคโลนีต่อกรัม เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง นาน 120 วัน ตามลำดับ และสามารถป้องกันการเกิดโรคในสภาวะแปลงปลูกได้ดีมีค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (% wilt incidence) เท่ากับ 16.67 เปอร์เซ็นต์

Chung, Huang and Huang (2005) ได้ศึกษาการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบเม็ด PBGG ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรีย *P. boreopolis* เมื่อนำ PBGG ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) มาผสมกับดินที่ใช้เพาะเมล็ดผักกวางตุ้ง พบว่าสามารถลดการเกาะติดบนเมล็ดของเชื้อราก่อโรค *R. solani* สาเหตุโรคโคนเน่าในผักกวางตุ้งได้ และเมื่อใช้ร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. จะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเพิ่มสูงขึ้น

González-Cabrera, Mollá, Montón and Urbaneja (2011) ศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมหนอนผีเสื้อชอนใบมะเขือเทศ (*Tuta absoluta* Meyrick) ของแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. thuringiensis* (Berliner) จำนวน 3 รูปแบบ พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. thuringiensis* ทั้ง 3 รูปแบบ ได้แก่ Dipel® (รูปแบบน้ำ) Turex® (รูปแบบผงละลายน้ำ) และ Costar® (รูปแบบเม็ดแกรนูลละลายน้ำ) มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนชอนใบมะเขือเทศได้สูงกว่าชุดควบคุม (ไม่ใช้แบคทีเรียสำเร็จรูป) โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป Costar® มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนชอนใบมะเขือเทศสูงสุด มีเปอร์เซ็นต์พื้นที่การถูกทำลาย (%Damaged area) เพียง 5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นแบคทีเรียสำเร็จรูป Dipel® (10 เปอร์เซ็นต์) และแบคทีเรียสำเร็จรูป

Turex® (20 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่ชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การถูกทำลาย 100 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป Costar® มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนชอนใบมะเขือเทศวัย 1 ได้ดีที่สุด และสามารถใช้แบคทีเรียสำเร็จรูป *B. thuringiensis* ควบคุมหนอนชอนใบมะเขือเทศได้โดยไม่ต้องใช้สารเคมีทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ สภาวะโรงเรือน และสภาวะแปลงปลูก

Hu et al. (2014) ศึกษาการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* ที่ก่อโรคในต้น oilseed rape ของแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. subtilis* BY-2 รูปแบบเม็ด (pellet) ในระดับโรงเรือน ผลการวิจัยพบว่าการใช้แบคทีเรียสำเร็จรูป *B. subtilis* BY-2 แบบคลุกเมล็ดร่วมกับการฉีดพ่น สามารถควบคุมเชื้อราก่อโรคได้ดี และให้ผลผลิตของ oilseed rape ที่สูงไม่แตกต่างกันกับการใช้สารเคมีควบคุมเชื้อรา

Kandibane, Kumar and Adiroubane (2010) ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. thuringiensis* Berliner รูปแบบเม็ดแกรนูลละลายน้ำในการควบคุมหนอนห่อใบข้าว (*Cnaphalocrocis medinalis* Guenee) พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. thuringiensis* ความเข้มข้น 2.5 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนห่อใบข้าวได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายจากหนอนห่อใบข้าวต่ำสุด เท่ากับ 8.21 เปอร์เซ็นต์ หลังการฉีดพ่นนาน 7 วัน ขณะที่แบคทีเรียสำเร็จรูป *B. thuringiensis* ที่ระดับความเข้มข้นอื่น 1.0-2.0 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ มีเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายจากหนอนห่อใบข้าวที่สูงกว่าในช่วง 9.20-11.20 เปอร์เซ็นต์ การใช้แบคทีเรียสำเร็จรูป *B. thuringiensis* ความเข้มข้น 2.5 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ ควบคุมหนอนห่อใบข้าวในระดับแปลงปลูกให้ผลผลิตเท่ากับ 28.58 กิโลกรัมต่อแปลง ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับแปลงทดสอบที่ใช้สารเคมี Monocrotophos 36 WSC (25.70 กิโลกรัมต่อแปลง)

Lee et al. (2006) ศึกษาการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. licheniformis* N1 แบบผงละลายน้ำ โดยใช้แป้งข้าวโพด น้ำมันมะกอก และน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ ในการผลิตสูตร เพื่อใช้ทดสอบการควบคุมเชื้อรา *Botrytis cinerea* สาเหตุของโรคราสีเทาในมะเขือเทศและเมื่อทำการทดสอบในโรงเรือน ด้วยวิธีการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงสูตร N1E ที่ความเข้มข้นเจือจาง 100 เท่า ลงบนต้นมะเขือเทศ พบว่าสามารถควบคุมการเกิดโรคได้ 90.50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารเคมีกำจัดฆ่าเชื้อราที่ใช้เป็นชุดควบคุมสามารถควบคุมการเกิดโรคได้ 77 เปอร์เซ็นต์

Manikandan et al.(2010) ทำการศึกษาการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *P. fluorescence* แบบน้ำโดยใช้สารเพิ่มเติมหรือปรับปรุง (amendment) ต่างชนิดกันในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium* สาเหตุโรคเน่าในมะเขือเทศโดยวิธีการคลุกเมล็ด พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำที่ใช้กลีเซอรอล (glycerol) เป็นสารเพิ่มเติมหรือปรับปรุง (amendment) มีจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตสูงสุดหลังการเก็บรักษานาน 6 เดือน และสามารถป้องกันการเกิดโรคในมะเขือเทศได้ดี มีค่า

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (% disease incidence) เท่ากับ 17.33 และ 4.81 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แบคทีเรียสำเร็จรูปด้วยวิธีคลุกเมล็ดและราดลงดิน ตามลำดับ

Matzen, Heick and Jørgensen (2019) ศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมโรคราแป้งในธัญพืช (ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวสาลี และข้าวโอ๊ต) ของแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. amyloliquefaciens* QST 713 รูปแบบน้ำเข้มข้น (suspension concentrate) พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. amyloliquefaciens* QST 713 มีประสิทธิภาพการควบคุมโรคราแป้งได้สูงสุด 65 เปอร์เซ็นต์ และมีผลผลิตของธัญพืชที่สูงไม่แตกต่างกันกับชุดทดสอบที่ใช้สารเคมีควบคุมเชื้อรา Prothioconazole และเมื่อใช้แบคทีเรียสำเร็จรูปร่วมกับสารเพิ่มประสิทธิภาพ (adjuvant) Silwet®Gold พบว่าประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราแป้งจะสูงขึ้น

Meng, Yu, Yu, Yin and Liu (2015) ศึกษาการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงแห้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* T429 เพื่อควบคุมโรคไหม้ในข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* พบว่าส่วนประกอบที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เหมาะสม ได้แก่ สารเปียกใบ AEO-5 สารช่วยกระจายตัว $(NH_4)_2SO_4$ สารแพร่กระจาย NNO และสารช่วยยึดเกาะ CMC-NA (Sodium Carboxymethyl Cellulose) ความเข้มข้น 1, 9, 5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใช้ดินขาว (kaolinite) เป็นสารเพิ่มเติมให้ได้ปริมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำการผสมส่วนประกอบกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า แบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผลิตได้มีลักษณะทางกายภาพที่ดี เก็บรักษาได้นานกว่า 12 เดือน และทดสอบในระดับแปลงปลูก พบว่าใช้แบคทีเรียสำเร็จรูปปริมาณ 50 และ 75 กรัมต่อ 667 ตารางเมตร มีประสิทธิภาพการควบคุมโรคไหม้ได้ 77.60 และ 78.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันกับสารเคมีกำจัดเชื้อรา Tricyclazole (79.50 เปอร์เซ็นต์)

Mwamburi, Laing and Miller (2011) ศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนแมลงวัน *Musca domestica* L. ของแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) รูปแบบแกรนูลละลายน้ำและสูตร bran formulation ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการและแปลงทดลอง พบว่าเมื่อแบคทีเรียสำเร็จรูป Bti มีความเข้มข้นสูงขึ้นเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนแมลงวัน *M. domestica* สูงขึ้นด้วย โดยภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการแบคทีเรียสำเร็จรูป Bti มีค่า LC_{50} เท่ากับ 65 และ 77.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะแปลงทดลองการใช้แบคทีเรียสำเร็จรูป Bti ความเข้มข้น 10 g Bti/kg สามารถลดจำนวนหนอนแมลงวันได้ 90 เปอร์เซ็นต์ และการใช้แบคทีเรียสำเร็จรูป Bti ที่ระดับความเข้มข้นสูง (2 กรัมต่อลิตร) ให้ประสิทธิภาพการควบคุมหนอนแมลงวันไม่แตกต่างกันกับที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร

Radja Commare et al. (2002) ได้ศึกษาการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปที่มีผงทัลคัมเป็นตัวกลางในการยึดเกาะของแบคทีเรีย *P. fluorescens* strains (PF1 และ FP7) ที่มีและไม่มีไคติน นำมาทดสอบการยับยั้งโรคกาบใบแห้งในข้าวโดยวิธีการคลุกเมล็ด จุ่มราก ผสมกับดิน และฉีดพ่นบนใบ พบว่าสามารถลดการเกิดโรคกาบใบแห้งทั้งในสภาวะโรงเรือนและแปลงทดลองได้ และเมื่อใช้แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ร่วมกันจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าใช้เพียงสายพันธุ์เดียว ส่วนการทดสอบในแปลงทดลอง พบว่าเมื่อใช้แบคทีเรียสำเร็จรูปของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์และมีไคตินร่วมด้วย จะมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคกาบใบแห้งได้มากถึง 62 เปอร์เซ็นต์

Rekha, Lai, Arun and Young (2007) ได้ศึกษาการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *P. putida* CC-FR2-4 และ *B. subtilis* CC-pg104 โดยวิธีการตรึงเซลล์แบคทีเรียในเม็ด alginate beads ร่วมกับการเติมกรด humic acid พบว่าในแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. subtilis* CC-pg104 ที่ตรึงเซลล์ในเม็ด alginate beads มีความสามารถในการเกาะติดบนเมล็ดผักกาด (*Lectuca sativa* L.) ได้ดีใกล้เคียงกับการใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียสด และยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของยอดและรากผักกาดได้ดี แสดงให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียสำเร็จรูป *B. subtilis* CC-pg104 ที่ตรึงเซลล์ในเม็ด alginate beads มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ดีเทียบเท่ากับการใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียสด มีความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมเกษตร

Ruiu et al. (2013) ศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนผีเสื้อกลางคืน *Lymantria dispar* L. และหนอน *Malacosoma neustria* L. แมลงศัตรูพืชไม้โอ๊ค (oak) ของสารฆ่าแมลงชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. thuringiensis* sv *kurstaki* (*Btk*) ที่ผลิตเป็นแบคทีเรียสำเร็จรูป จำนวน 3 รูปแบบ ได้แก่ แบบสารแขวนลอยเข้มข้น (suspension concentrate) แบบน้ำ (liquid formulation) และแบบเม็ดละลายน้ำ (granule formulation) พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป Btk ทั้ง 3 รูปแบบ มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนผีเสื้อกลางคืน *L. dispar* และหนอน *M. neustria* ที่สูง โดยรูปแบบน้ำ (ความเข้มข้น 2.10 เปอร์เซ็นต์) และรูปแบบเม็ดละลายน้ำ (ความเข้มข้น 7.50 เปอร์เซ็นต์) สามารถควบคุมหนอนผีเสื้อกลางคืน *L. dispar* และหนอน *M. neustria* ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การหลุดร่วงของใบที่ต่ำ (% Defoliation) เท่ากับ 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. thuringiensis* ที่จำหน่ายทางการค้า (10 เปอร์เซ็นต์)

Sabaratnam and Traquair (2002) ศึกษาการผลิตรูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *Streptomyces* sp. Di-944 ที่ใช้ควบคุมโรคโคนเน่าในต้นมะเขือเทศ พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงของแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. Di-944 ที่มีผงทัลคัม $Mg_3(SiO_3)_3(Si(O))(OH)_2$ และ kaolin เป็นส่วนประกอบ พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคโคนเน่าในต้นมะเขือเทศ ด้วยวิธีการคลุกเมล็ด และเมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 14 สัปดาห์ พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียคงที่ และเมื่อสิ้นสุดเดือนที่ 6 ของการเก็บรักษา พบว่ามีการรอดชีวิตลดลง โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตคงเหลือ 1.2×10^{5} โคโลนีต่อกรัม

Senthilraja, Anand, Durairaj, Raguchander and Samiyappan (2010) ศึกษาประสิทธิภาพแบคทีเรียสำเร็จรูป *P. fluorescens* TDK 1 และ Pf1 รูปแบบผงละลายน้ำในการควบคุมหนอนชอนใบ (*Aproaerema modicella* Deventer) และเชื้อราก่อโรคโคนเน่า (*Sclerotium rolfsii*) ในถั่วลิสง พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป *P. fluorescens* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนชอนใบและเชื้อราโรคโคนเน่าได้สูง มีเปอร์เซ็นต์การควบคุมการทำลายและการเกิดโรคในช่วง 61.11-77.77 และ 72.22-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป *P. fluorescens* TDK 1+Pf1+chitin มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนชอนใบและเชื้อราโรคโคนเน่าได้สูงสุดเท่ากับ 77.77 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีผลผลิตถั่วลิสงที่สูงเท่ากับ 250 กรัมต่อแปลง ซึ่งสูงกว่าแปลงทดสอบที่ใช้สารเคมี (150 กรัมต่อแปลง)

Solanki, Yandigeri, Kumar, Singh and Srivastava (2019) ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในมะเขือเทศ *Rhizoctonia solani* โดยใช้ชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ผสมสำเร็จรูปแบบน้ำที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. velezensis* MB101 (BV) ผสมกับเชื้อรา *Trichoderma lixii* NAIMCC-F-01760 (TL) (BV+TL) เมื่อทดลองประยุกต์ใช้ชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ผสมสำเร็จรูป BV+TL ในระดับโรงเรือนและแปลงปลูก พบว่าชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ผสมสำเร็จรูป BV+TL มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราก่อโรคในมะเขือเทศได้สูงสุด 76 เปอร์เซ็นต์

Tamez-Guerra, Mcguire, Behle, Shasha and Wong (2000) ศึกษาการพัฒนาแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. thuringiensis* รูปแบบแคปซูลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมศัตรูพืชในแต่ละสภาวะการนำไปใช้ พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. thuringiensis* ที่ผสมสารลิกนินและแป้งข้าวโพดมีประสิทธิภาพการควบคุมหนอนเจาะลำต้นข้าวโพด (*Ostrinia nubilalis* Hubner) ในสภาวะห้องปฏิบัติการได้ 51.60 และ 75.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมหนอนเจาะลำต้นข้าวโพดในสภาวะที่มีแสงแดด พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผสมแป้งข้าวโพดและผสมลิกนิน มีเปอร์เซ็นต์การควบคุมหนอนเจาะลำต้นข้าวโพดเท่ากับ 78.50 และ 70.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพการควบคุมที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. thuringiensis* ทางการค้า Dipel (72.30 เปอร์เซ็นต์)

Tamreihao et al. (2016) ศึกษาการผลิตชีวภัณฑ์สำเร็จรูป *Streptomyces corchorusii* UCR3-16 รูปแบบผงละลายน้ำ เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืชและใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในแปลงเพาะปลูกข้าว ผลการวิจัยพบว่าชีวภัณฑ์สำเร็จรูป *S. corchorusii* UCR3-16 แบบผงละลายน้ำที่ใช้สารตัวพาเป็นผงทัลคัม (talcum) ยังคงมีปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่รอดชีวิตสูงเมื่อ

ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเมื่อทดสอบในระดับแปลงปลูกพบว่าชีวภัณฑ์สำเร็จรูปช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้ดีและมีผลผลิตที่สูง

Wiwattanapatapee et al. (2004) ศึกษาการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบเม็ดลอยน้ำของแบคทีเรีย *B. megaterium* โดยมีน้ำมันพืชชนิดอิ่มตัว (HVO) เซลลูโลสผลึกละเอียด น้ำตาลแลคโตส สาร crosslinked sodium, คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose; CMC) และสารเมีกำจัดเชื้อรา Iprodione ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *R. solani* พบว่าในเม็ด (pellet) มีแบคทีเรีย 10^{7}-10^{8} โคโลนีต่อกรัม เมื่อผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือนและเมื่อทดลองในโรงเรือนกระจกสามารถยับยั้งโรคกาบใบแห้งในข้าวได้

Wiwattanapatapee et al. (2007) ศึกษาการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปของแบคทีเรีย *B. megaterium* แบบแกรนูลละลายน้ำเพื่อใช้ควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าว ซึ่งในแบคทีเรียสำเร็จรูปจะประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส (lactose) สาร polyvinyl pyrrolidone K-30 (PVP, K-30) กรดซิตริก (citric acid) กรดทาร์ทาริก (tartaric acid) และโซเดียมไบคาร์บอนเนต (sodium bicarbonate) เมื่อแกรนูลผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน ที่อุณหภูมิห้องพบแบคทีเรียที่รอดชีวิต 10^{9} โคโลนีต่อกรัม และเมื่อฉีดพ่นบนใบพืชพบแบคทีเรียคงอยู่ 10^{6} โคโลนีต่อกรัม นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคกาบใบแห้งเมื่อทดสอบในสภาวะโรงเรือน

Wiwattanapatapee et al. (2013) ทำการศึกษาการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบแคปซูลแขวนลอย โดยการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย *B. megaterium* ด้วย calcium alginate microcapsule เพื่อควบคุมเชื้อรา *R. solani* ก่อโรคใบไหม้ในข้าว พบว่าแคปซูลแขวนลอยแบคทีเรีย *B. megaterium* (ความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ที่ความเข้มข้นเจือจาง 100 เท่า สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ หลังการเก็บรักษานาน 12 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) และยังพบว่าแคปซูลแขวนลอยแบคทีเรีย *B. megaterium* มีความทนทานต่อรังสียูวีและสภาวะอุณหภูมิสูง (80 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง)

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

รูปแบบของการวิจัย

3.1 สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการวิจัย

ไรไข่ปลา *Luciaphorus perniciosus* (Rack)

แบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* PB09

เห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulas* (Mont.)

3.2 สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย
   - 1.1 Beef extract (Criterion, USA)
   - 1.2 Peptone (Criterion, USA)
   - 1.3 Dextrose (Khonkaen medical equipment Ltd, Thailand)
   - 1.4 Potato Dextrose Agar (Criterion, USA)
   - 1.5 Sodium chloride (NaCl) (Ajax Finechem, Germany)
   - 1.6 Triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Sigma Chemical, USA)
   - 1.7 Bromothymol Blue (BTB) (Labchem, England)
   - 1.8 Tryptone (MERCK, Germany)
   - 1.9 Yeast extracts (Criterion, USA)
   - 1.10 ผงวุ้น (Agar) (BDH, England)
   - 1.11 สารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ด Propargite (Omite 20, Thailand)
   - 1.12 สารเคมีกำจัดกำจัดไรศัตรูเห็ด Carbaryl (Savin 85, Thailand)

1.13 น้ำตาลซูโครส (Mitrphol, Thailand)

1.14 แป้งข้าวโพด (Super-Find, Thailand)

1.15 แป้งมันสำปะหลัง (Big C, Thailand)

1.16 แป้งข้าวเจ้า (Big C, Thailand)

1.17 ผงทัลคัม (Labchem, England)

1.18 ดินขาว (Kaolinite) (Labchem, England)

1.19 น้ำมันปาล์ม (Oleen, Thailand)

1.20 น้ำมันข้าวโพด (Morakot, Thailand)

1.21 น้ำมันถั่วเหลือง (A-ngoon, Thailand)

1.22 น้ำมันมะกอก (Bertolli, Italy)

1.23 เอธิลแอลกอฮอล์ (BDH Prolabo, France)

1.24 Tween 20, Tween 80 (Pubchem, USA)

2. วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.1 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

2.2 cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร

2.3 แท่งแก้วคนสาร

2.4 กระบอกตวง (cylinder)

2.5 บิกเกอร์ (beaker)

2.6 ฟลาสก์ (flask) (Duran, Germany)

2.7 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (plate) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

2.8 ชุดกรองมิลลิพอร์ (millipore filter) (Duran, Germany)

2.9 ไมโครปิเปต (micropipette) (Biohit, France)

2.10 ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร)

2.11 ตะแกรงร่อนขนาด 200 mesh (Retsch, Germany)

2.12 เครื่องชั่ง (balance) (Mettler-Toledo, U.S.A.)

2.13 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Memmert GmbH Co, Germany)

2.14 ไมโครเวฟ (microwave) (Turbora, Thailand)

2.15 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) (Hirayama manufacturing corporation, Japan)

2.15 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Nikon, Japan)

2.16 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Nikon, Japan)

2.17 กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) (LEO 1450 VP, Germany)

2.18 กล้องถ่ายรูป

2.19 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (PCL Holding, Germany)

2.20 ตู้เขี่ยเชื้อแบบลามินาร์โฟลว์ (laminar flow) (Ehret, Italy)

2.21 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) (New Brunswick scientific Co, U.S.A.)

2.22 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectophotometer) (Shimadzu, Japan)

2.23 ตู้บ่ม (incubator) (Memmert GmbH Co, Germany)

2.24 เครื่องปั่นละเอียดไฟฟ้า (warning blender) (Philips, Thailand)

2.25 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) (Memmert GmbH Co, Germany)

2.26 เครื่องวัดความหนืด (viscometer) (Brookfield DV-II+, Canada)

2.27 เครื่องวัดค่าความชื้น (moisture meter) (Mettler Toledo, U.S.A.)

2.28 เครื่องวัดความชื้น (thermo-hygrometer) (TH90 Thermo-Hygrometer, Thailand)

2.29 เครื่อง Liquid Chromatography Mass spectrometer (LC-MS)

3.3 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมการทดลอง

3.3.1.1 การเตรียมเส้นใยเห็ดขอนขาว (*L. squarrosulus*)

นำหัวเชื้อเห็ดขอนขาวจากฟาร์มเห็ดแม่ไพบูรณ์ อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม มาทำการเพาะเลี้ยง 2 วิธี คือ

1) นำเส้นใยเห็ดขอนขาวมาทำการเพาะบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ในจานเพาะเชื้อเพื่อใช้เป็นอาหารของไรไข่ปลาที่ใช้ในการทดสอบ โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่เต็ม วางคว่ำลงในจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหาร PDA อยู่เพื่อให้เส้นใยเห็ดเจริญต่อไป

2) นำเชื้อเห็ดขอนขาวมาเพาะในขวดแก้วฝาเกลียวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 8.50 เซนติเมตร เพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับการเตรียมไรไข่ปลาที่ใช้ทดสอบ โดยใส่ส่วนผสมของวัสดุเพาะที่ใช้ในการเพาะเห็ด ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์มเห็ด

แม่ไพบูรณ์ อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม ให้มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร จากก้นขวด นำไปฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเส้นใยเห็ดขอนขาวลงไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกว่าเส้นใยเห็ดขอนขาวเจริญเต็มขวด

3.3.1.2 การเตรียมไรไข่ปลา (*L. perniciosus*)

ทำการเตรียมไรไข่ปลา โดยนำไรไข่ปลาจากก้อนเห็ดที่ไรไข่ปลาระบาดอยู่จากฟาร์มระพีพรรณ จังหวัดขอนแก่น ใส่ลงในขวดแก้วที่มีเส้นใยเห็ดขอนขาวเจริญที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.1.1(2) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

3.3.1.3 การเตรียมแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09

1) ทำการแยกแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับไส้เดือนฝอย ตามวิธีการของ Kaya and Stock (1997) โดยแยกเชื้อแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 จากไส้เดือนฝอยที่ก่อโรคในแมลง *Steinernema siamkayai* โดยการปล่อยไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile เข้าทำลายหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง หลังจากหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งตายจึงใช้กรรไกรผ่าตัดตัดช่องท้องเพื่อให้เกิดช่องเปิด จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อแตะของเหลวที่ไหลออกมาจากช่องท้องของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งไปลากผ่านบนอาหารแข็ง Nutrient Bromothymol blue Triphenyltetrazolium chloride Agar (NBTA) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำโคโลนีมาแยกใหม่จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ ของแบคทีเรีย แล้วนำไปเก็บในอาหารแข็ง Luria bertani agar (LB slant) สำหรับเก็บรักษาแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2) การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 สำหรับผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป

2.1) การเตรียมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ลงในอาหารเหลว LB (LB broth) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นใช้เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปริมาตรหัวเชื้อเริ่มต้น 9 เปอร์เซ็นต์ เติมลงในถังหมักขนาด 7 ลิตร บรรจุอาหารเหลว LB ปริมาตร 4.5 ลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อนาที และความเร็วในการกวน 200 รอบต่อนาที (Wang and Zhang, 2007) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย (cell suspension) ที่มีความเข้มข้นในช่วง 10^{8}-10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.2) การเตรียมตะกอนเซลล์แบคทีเรียและส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์

นำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้มาทำการกรองผ่านเยื่อกรองสุญญากาศไนลอน (vacuum filtration nylon) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 ไมโครเมตร

จากนั้นแยกแบคทีเรียเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ (cell-free supernatant) และส่วนตะกอนเซลล์ (bacterial pellet) ที่ได้จากการกรองเซลล์มาทำการแขวนลอยในสารละลาย 0.85% NaCl

3.3.2 การทดลอง

3.3.2.1 การพัฒนารูปแบบแบคทีเรียร่วมอาศัยในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อควบคุมไรศัตรูเห็ดในระดับห้องปฏิบัติการ

1) ศึกษารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่เหมาะสมในการทำลายไรไข่ปลา

ทำการผลิตรูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูปโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Lee et al. (2006)

1.1) การผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปในรูปแบบผงละลายน้ำ (wettable powder)

นำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่มีความเข้มข้นเซลล์ในช่วง 10^{9}-10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาผสมกับส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปดังตารางที่ 3 จากนั้นทำให้แห้งโดยการอบในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง บดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าและกรองผ่านตัวกรองขนาด 200 mesh จากนั้นทำการชั่งน้ำหนัก

1.2) การผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปในรูปแบบน้ำ (liquid formulations)

นำส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ (cell-free supernatant) และตะกอนเซลล์แบคทีเรีย (bacterial pellet) ที่แขวนลอยในสารละลาย 0.85% NaCl มาทำการผสมกับส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตร Liquid supernatant (LS) และสูตร Liquid cell pellet (LC) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

1.3) ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในการทำลายไรไข่ปลา

นำแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ทั้ง 3 รูปแบบ ที่ผลิตได้มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาตามวิธีการของ Bussaman et al. (2009) โดยนำแบคทีเรียสำเร็จรูปมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สำหรับ WP และความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) สำหรับ LCและ LS จากนั้นนำแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 3 รูปแบบ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาทำการทดสอบโดยการฉีดพ่นด้วยกระบอกฉีดพ่นขนาดเล็ก (minifoggy) ลงบนจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหารแข็ง PDA ซึ่งมีเส้นใยเห็ดขอนขาวเจริญเต็มบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นจึงนำไรเพศเมียซึ่งออกจากท้องแม่ประมาณ 1 วัน

จำนวน 100 ตัววางบนจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหารแข็ง PDA และนำจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหารทั้งหมด ไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บันทึกการตายของไรไข่ปลาทุกวันเป็นเวลา 5 วัน ใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ส่วนใสที่ผ่านการกรอง อาหารเหลว LB และสารเคมีฆ่าไร (propargite) เป็นชุดควบคุม ทำการทดลอง 4 ซ้ำ

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09

รูปแบบ	**ส่วนประกอบ**		
ผงละลายน้ำ	เซลล์แขวนลอย	1,000	มิลลิลิตร
Wettable Powder (WP)	แป้งข้าวโพด	100	กรัม
	น้ำมันมะกอก	12.50	มิลลิลิตร
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม
ส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์	ส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์	1,000	มิลลิลิตร
Liquid supernatant (LS)	แป้งข้าวโพด	12.50	กรัม
	Tween 20	2	มิลลิลิตร
	เอทานอล	1.25	มิลลิลิตร
ตะกอนเซลล์แบคทีเรีย	ตะกอนเซลล์แบคทีเรีย	1,000	มิลลิลิตร
Liquid cell pellet (LC)	แป้งข้าวโพด	12.50	กรัม
	Tween 20	2	มิลลิลิตร
	เอทานอล	1.25	มิลลิลิตร

ที่มา: ดัดแปลงจากวิธีการของ Lee et al. (2006)

1.4) ศึกษาความคงตัวของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในการทำลายไรไข่ปลา

นำแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ทั้ง 3 รูปแบบ ได้แก่ WP, LC และ LS มาทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ในสภาวะมืด ที่ระยะเวลาต่างๆ คือ 0, 15, 30, 45 และ 60 วัน จากนั้นนำแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ มาทำการศึกษาจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิตและทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาตามวิธีการของ Bussaman et al. (2009)

2) การพัฒนารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในการทำลายไรไข่ปลา

2.1) ศึกษาความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป

นำแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 รูปแบบที่มีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาได้ดีที่สุดจากการศึกษารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เหมาะสมในการทำลายไรไข่ปลา คือ แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 รูปแบบผงละลายน้ำ (wettable powder, WP) ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบดังกล่าวมาทำการพัฒนารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป โดยทำการดัดแปลงจากวิธีการศึกษาของ Lee et al. (2006) ใช้เซล์แขวนลอยแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นในการผลิตสูตรในช่วง $1.16x10^{10}$-$1.22x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วทำการแปรผันระดับความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 เป็น 4 ระดับ มีรายละเอียดของส่วนประกอบในการพัฒนาสูตรดังแสดงในตารางที่ 4 จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผลิตได้ ดังนี้

คุณสมบัติทางกายภาพ (physical characterization)

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ทำการวัดค่า pH ของแบคทีเรียสำเร็จรูปแต่ละสูตรที่ผลิตได้ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ด้วยเครื่อง pH meter

วัดค่าความหนืด (viscosity) ทำการวัดค่าความหนืดของแบคทีเรียสำเร็จรูปแต่ละสูตรที่ผลิตได้ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ด้วยเครื่องวัดความหนืด Brookfield viscometer ที่มีขนาดเข็ม #18 ความเร็วรอบ 30 รอบต่อนาที

คุณสมบัติทางชีวภาพ (biological characterization)

ทำการตรวจสอบความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 หลังการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปในแต่ละสูตรด้วยวิธีการเจือจางลำดับส่วน (dilution plating method) โดยการนำตัวอย่างแบคทีเรียสำเร็จรูปปริมาณ 1 กรัม ผสมลงในสารละลาย 0.85% NaCl และทำการเจือจางลำดับส่วน จากนั้นทำการกระจายตัวอย่างที่เจือจางแต่ละความเข้มข้นลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง LB (spread plate) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีและคำนวณความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิต

ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในการทำลายไรไข่ปลา

ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยต่างๆ กัน โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาตามวิธีการของ Bussaman et al. (2009)

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียต่างกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	**ส่วนประกอบ**			**ความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียหลังการผลิตสูตร (โคโลนีต่อกรัม)**
WP/CS-1	**เซลล์แขวนลอย**	**1,000**	**มิลลิลิตร**	2.98×10^{8}
	แป้งข้าวโพด	100	กรัม	
	น้ำมันมะกอก	12.50	มิลลิลิตร	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	
WP/CS -2	**เซลล์แขวนลอย**	**500**	**มิลลิลิตร**	2.92×10^{7}
	แป้งข้าวโพด	100	กรัม	
	น้ำมันมะกอก	12.50	มิลลิลิตร	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	
WP/CS -3	**เซลล์แขวนลอย**	**250**	**มิลลิลิตร**	2.63×10^{6}
	แป้งข้าวโพด	100	กรัม	
	น้ำมันมะกอก	12.50	มิลลิลิตร	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	
WP/CS -4	**เซลล์แขวนลอย**	**125**	**มิลลิลิตร**	1.57×10^{5}
	แป้งข้าวโพด	100	กรัม	
	น้ำมันมะกอก	12.50	มิลลิลิตร	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	
WP/CS-control	**อาหารเหลว LB**	**1,000**	**มิลลิลิตร**	-
	แป้งข้าวโพด	100	กรัม	
	น้ำมันมะกอก	12.50	มิลลิลิตร	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	

2.2) ศึกษาสารตัวพาที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป

นำแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาได้ดีที่สุดจากการศึกษาความเข้มข้นเซลล์ที่เหมาะสมในการทำลายไรไข่ปลา คือแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีระดับความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรีย $2.98x10^{8}$ โคโลนีต่อกรัม (WP/CS-1) ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตร WP/CS-1 ที่มีส่วนประกอบในการผลิตสูตรดังแสดงในตารางที่ 4 มาทำการพัฒนารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป ดัดแปลงจากวิธีการศึกษาของ Lee et al. (2006) โดยการแปรผันชนิดของสารตัวพา (carrier) ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ แป้งข้าวโพด (corn starch; C) แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch; Ca) แป้งข้าวเจ้า (rice flour; RF) ผงทัลคัม (Talcum; T) และดินขาว (kaolinite; K) มีรายละเอียดของส่วนประกอบในการผลิตสูตรดังแสดงในตารางที่ 5 จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผลิตได้ ดังนี้

คุณสมบัติทางกายภาพ (physical characterization)

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ทำการวัดค่า pH ของแบคทีเรียสำเร็จรูปแต่ละสูตรที่ผลิตได้ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ด้วยเครื่อง pH meter

วัดค่าความหนืด (viscosity) ทำการวัดค่าความหนืดของแบคทีเรียสำเร็จรูปแต่ละสูตรที่ผลิตได้ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ด้วยเครื่องวัดความหนืด Brookfield viscometer ที่มีขนาดเข็ม #18 ความเร็วรอบ 30 รอบต่อนาที

วัดค่าความชื้น (moisture content) ทำการวัดค่าความชื้นของแบคทีเรียสำเร็จรูปแต่ละสูตรที่ผลิตได้ ด้วยเครื่องวัดค่าความชื้น (moisture meter)

คุณสมบัติทางชีวภาพ (biological characterization)

ทำการตรวจสอบความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 หลังการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปในแต่ละสูตรด้วยวิธีการเจือจางลำดับส่วน (dilution plating method) โดยการนำตัวอย่างแบคทีเรียสำเร็จรูปปริมาณ 1 กรัม ผสมลงในสารละลาย 0.85% NaCl และทำการเจือจางลำดับส่วน จากนั้นทำการกระจายตัวอย่างที่เจือจางแต่ละความเข้มข้นลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง LB (spread plate) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีและคำนวณความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตในแบคทีเรียสำเร็จรูปที่มีสารตัวพาต่างชนิดกัน

ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในการทำลายไรไข่ปลา

ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีสารตัวพาต่างชนิดกัน โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาตามวิธีการของ Bussaman et al. (2009)

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ใช้สารตัวพา (carrier) ต่างชนิดกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	**ส่วนประกอบ**			**ความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียหลังการผลิตสูตร (โคโลนีต่อกรัม)**
WP/CS-C	เซลล์แขวนลอย	1,000	มิลลิลิตร	1.08×10^{8}
	แป้งข้าวโพด	**100**	**กรัม**	
	น้ำมันมะกอก	12.50	มิลลิลิตร	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	
WP/CS-Ca	เซลล์แขวนลอย	1,000	มิลลิลิตร	1.02×10^{8}
	แป้งมันสำปะหลัง	**100**	**กรัม**	
	น้ำมันมะกอก	12.50	มิลลิลิตร	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	
WP/CS-RF	เซลล์แขวนลอย	1,000	มิลลิลิตร	1.04×10^{8}
	แป้งข้าวเจ้า	**100**	**กรัม**	
	น้ำมันมะกอก	12.50	มิลลิลิตร	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	
WP/CS-T	เซลล์แขวนลอย	1,000	มิลลิลิตร	5.20×10^{7}
	ผงทัลคัม	**100**	**กรัม**	
	น้ำมันมะกอก	12.50	มิลลิลิตร	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	
WP/CS-K	เซลล์แขวนลอย	1,000	มิลลิลิตร	4.50×10^{7}
	ดินขาว	**100**	**กรัม**	
	น้ำมันมะกอก	12.50	มิลลิลิตร	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ใช้สารตัวพา (carrier) ต่างชนิดกัน (ต่อ)

แบคทีเรียสำเร็จรูป	ส่วนประกอบ			ความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียหลังการผลิตสูตร (โคโลนีต่อกรัม)
WP/CS-control	อาหารเหลว LB	1,000	มิลลิลิตร	-
	แป้งข้าวโพด	**100**	**กรัม**	
	น้ำมันมะกอก	12.50	มิลลิลิตร	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	

2.3) ศึกษาสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป

นำแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาได้ดีที่สุด มีระดับความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียและสารตัวพาที่เหมาะสม คือแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 รูปแบบผงระดับความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยในช่วง 10^8 โคโลนีต่อกรัม (WP/CS-1) ผสมสารตัวพาแป้งข้าวเจ้า (WP/CS-RF) ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตรดังกล่าวที่มีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 5 (WP/CS-RF) มาทำการพัฒนารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป โดยดัดแปลงจากวิธีการศึกษาของ Lee et al. (2006) ทำการแปรผันชนิดของสารลดแรงตึงผิว (surfactant) จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมันมะกอก (olive oil; O) น้ำมันข้าวโพด (corn oil; C) น้ำมันปาล์ม (palm oil; P) และน้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil; S) มีรายละเอียดของส่วนประกอบในการผลิตสูตรดังแสดงในตารางที่ 6 จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผลิตได้ ดังนี้

คุณสมบัติทางกายภาพ (physical characterization)

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ทำการวัดค่า pH ของแบคทีเรียสำเร็จรูปแต่ละสูตรที่ผลิตได้ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ด้วยเครื่อง pH meter

วัดค่าความหนืด (viscosity) ทำการวัดค่าความหนืดของแบคทีเรียสำเร็จรูปแต่ละสูตรที่ผลิตได้ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ด้วยเครื่องวัดความหนืด Brookfield viscometer ที่มีขนาดเข็ม #18 ความเร็วรอบ 30 รอบต่อนาที

คุณสมบัติทางชีวภาพ (biological characterization)

ทำการตรวจสอบความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 หลังการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปในแต่ละสูตรด้วยวิธีการเจือจางลำดับส่วน (dilution plating method)

โดยนำตัวอย่างแบคทีเรียสำเร็จรูปปริมาณ 1 กรัม ผสมลงในสารละลาย 0.85%NaCl และทำการเจือจางลำดับส่วน จากนั้นทำการกระจายตัวอย่างที่เจือจางแต่ละความเข้มข้นลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง LB (spread plate) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีและคำนวณความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตในแบคทีเรียสำเร็จรูปที่มีสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน

ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในการทำลายไรไข่ปลา

ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีสารลดแรงตึงผิวต่างกัน โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาตามวิธีการของ Bussaman et al. (2009)

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ต่างชนิดกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	**ส่วนประกอบ**			**ความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียหลังการผลิตสูตร (โคโลนีต่อกรัม)**
WP/CS-O	เซลล์แขวนลอย	1,000	มิลลิลิตร	$1.12x10^{8}$
	แป้งข้าวเจ้า	100	กรัม	
	น้ำมันมะกอก	**12.50**	**มิลลิลิตร**	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	
WP/CS-C	เซลล์แขวนลอย	1,000	มิลลิลิตร	$1.18x10^{8}$
	แป้งข้าวเจ้า	100	กรัม	
	น้ำมันข้าวโพด	**12.50**	**มิลลิลิตร**	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	
WP/CS-P	เซลล์แขวนลอย	1,000	มิลลิลิตร	$1.24x10^{8}$
	แป้งข้าวเจ้า	100	กรัม	
	น้ำมันปาล์ม	**12.50**	**มิลลิลิตร**	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ต่างชนิดกัน (ต่อ)

แบคทีเรียสำเร็จรูป	ส่วนประกอบ			ความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียหลังการผลิตสูตร (โคโลนีต่อกรัม)
WP/CS-S	เซลล์แขวนลอย	1,000	มิลลิลิตร	1.30×10^8
	แป้งข้าวเจ้า	100	กรัม	
	น้ำมันถั่วเหลือง	**12.50**	**มิลลิลิตร**	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	
WP/CS-control	อาหารเหลว LB	1,000	มิลลิลิตร	-
	แป้งข้าวเจ้า	100	กรัม	
	น้ำมันมะกอก	12.50	มิลลิลิตร	
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม	

2.4) ศึกษาความคงตัวของประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

นำแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการพัฒนาและมีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาได้ดีที่สุด คือ แบคทีเรียสูตร WP/CS-XS โดยมีส่วนประกอบต่างๆ ที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้นเซลล์แขวนลอย 10^8 โคโลนีต่อกรัม สารตัวพาเป็นแป้งข้าวเจ้า (rice flour) และสารลดแรงตึงผิวเป็นน้ำมันปาล์ม (palm oil) ดังแสดงส่วนประกอบในตารางที่ 7 มาทดสอบประสิทธิภาพความคงตัวในการทำลายไรไข่ปลา โดยทำการเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตร WP/CS-XS ในสภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน จากนั้นนำแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ มาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

คุณสมบัติทางกายภาพ (physical characterization)

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ทำการวัดค่า pH ของแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ด้วยเครื่อง pH meter

วัดค่าความหนืด (viscosity) ทำการวัดค่าความหนืดของแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ด้วยเครื่องวัดความหนืด Brookfield viscometer ที่มีขนาดเข็ม #18 ความเร็วรอบ 30 รอบต่อนาที

วัดค่าความชื้น (moisture content) ทำการวัดค่าความชื้นของแบคทีเรียสำเร็จรูปด้วยเครื่องวัดค่าความชื้น (moisture meter)

คุณสมบัติทางชีวภาพ (biological characterization)

ศึกษาจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาด้วยวิธีการเจือจางลำดับส่วน (dilution plating method) โดยการนำตัวอย่างแบคทีเรียสำเร็จรูปปริมาณ 1 กรัม ผสมลงในสารละลาย 0.85% NaCl และทำการเจือจางลำดับส่วน จากนั้นทำการกระจายตัวอย่างที่เจือจางแต่ละความเข้มข้นลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง LB (spread plate) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีและคำนวณความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตในแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

ศึกษาลักษณะการเกาะติดหรือความคงอยู่ของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน โดยการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) LEO รุ่น 1450 VP ทำการศึกษา ณ ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งมีขั้นตอนเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาดังนี้

1) เตรียมแท่งติดชิ้นงาน (specimens stub) โดยทำการติดแผ่นเทปคาร์บอน (conductive tape) ลงบนผิวหน้าของแท่งติดชิ้นงาน

2) ใช้ไม้พันสำลีตักตัวอย่างผงแบคทีเรียสำเร็จรูป (WP/CS-XS) แล้วเคาะเบาๆ ให้ผงตัวอย่างตกกระจายลงบนแท่งติดชิ้นงานตามแรงที่เคาะ โดยพยายามติดให้อนุภาคเรียงตัวในลักษณะชั้นเดียวไม่เกาะกลุ่มกันเพื่อให้การฉาบผิว จากนั้นใช้ลูกยางเป่าฝุ่นหรืออนุภาคผงที่ไม่ติดออก

3) นำแท่งติดชิ้นงานที่มีตัวอย่างผงแบคทีเรียสำเร็จรูปมาทำการฉาบผิวด้วยทอง (coating) นาน 150 วินาที เพื่อทำให้พื้นผิวตัวอย่างมีคุณสมบัตินำไฟฟ้า ซึ่งทำการฉาบผิวตัวอย่างด้วยเครื่อง sputter coater โดยตัวอย่างจะวางไว้ที่ขั้วแอโนด (anode) และโลหะที่ใช้ฉาบอยู่ที่ขั้วแคโทด (cathode) ในการฉาบจะดูดอากาศออกให้อยู่ในสภาวะสุญญากาศ แล้วให้กระแสไฟฟ้าและปล่อยก๊าซอาร์กอน (Ar) เข้าไปใน chamber โดยก๊าซอาร์กอนจะเคลื่อนไปที่ขั้ว cathode และชนแผ่นทองทำให้แตกตัวเป็นโมเลกุลกระจายไปทั่ว chamber แล้วค่อยๆ เคลือบลงบนตัวอย่าง ความหนาของผิวฉาบควรอยู่ระหว่าง 10 -20 มิลลิเมตร

4) นำตัวอย่างที่ผ่านการฉาบผิวด้วยทองมาทำการศึกษาการเกาะติดหรือความคงอยู่ของเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในผงแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะและระยะเวลาต่างกัน ภายใต้จุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) LEO รุ่น 1450 VP

ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในการทำลายไรไข่ปลา

ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาตามวิธีการของ Bussaman et al. (2009)

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาได้ดีที่สุด

แบคทีเรียสำเร็จรูป	**ส่วนประกอบ**		
WP/CS-XS	เซลล์แขวนลอย	1,000	มิลลิลิตร (10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร)
	แป้งข้าวเจ้า	100	กรัม
	น้ำมันปาล์ม	12.50	มิลลิลิตร
	น้ำตาลซูโครส	12.50	กรัม

3.3.2.2 การศึกษาประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูปในระดับโรงเรือน

นำแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 รูปแบบผงละลายน้ำ (WP/CS-XS) ที่ผ่านการพัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาในระดับห้องปฏิบัติการ มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาในก้อนเห็ดขอนขาวในระดับโรงเรือน โดยทำการบันทึกผลผลิตเห็ดขอนขาวต่อก้อน ค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพ (biological efficiency; %B.E.) วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการเห็ดขอนขาว (proximate analysis) และปริมาณสารเคมีคาร์บาริลกำจัดไรศัตรูเห็ดตกค้าง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม มีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1) การเตรียมก้อนเห็ดขอนขาวเพื่อใช้ในการทดสอบ

ทำการเตรียมก้อนเห็ดขอนขาวสำหรับใช้การทดสอบระดับโรงเรือน ทำการผสมส่วนประกอบในการผลิตก้อนเห็ดขอนขาวตามวิธีการของ อภิชาต ศรีสะอาด และจันทรา อู่สุวรรณ (2556) ดังแสดงในตารางที่ 8 ทำการเตรียมก้อนเห็ดขอนขาวเพื่อใช้ทดสอบ

ณ ฟาร์มเห็ดแม่ไพบูรณ์ บ้านทุ่งนาเรา ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม ทำการผสมส่วนประกอบต่างๆ ให้เข้ากันดีและบรรจุในถุงพลาสติกทนร้อน ขนาด 7 x 12 นิ้ว โดยทำการบรรจุส่วนผสมลงในถุงพลาสติก ให้มีน้ำหนักประมาณ 800-1,000 กรัม สวมคอขวดใช้ยางรัดแล้วปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ความดัน 15-20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อถุงอาหารเพาะเสร็จปล่อยให้เย็น และทำการเขี่ยหัวเชื้อเห็ดขอนขาวบริสุทธิ์ที่เตรียมไว้ลงในถุงอาหารเพาะเห็ดโดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่าง 10-15 เมล็ดต่อถุง แล้วนำไปพักบ่มเส้นใยเจริญในโรงเรือนหรือตู้บ่มที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 28-30 วัน

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบในการผลิตก้อนเห็ดขอนขาวจำนวน 100 ก้อน

ส่วนประกอบ	ปริมาณ	
ขี้เลื่อยไม้ยางพารา	100	กิโลกรัม
รำละเอียด	10	กิโลกรัม
แร่ธาตุภูไมท์ (pumice)	2.0	กิโลกรัม
ปูนขาว (CaO)	2.0	กิโลกรัม
ยูเรีย (CH_4N_2O)	0.2	กิโลกรัม
ดีเกลือ ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กิโลกรัม
ความชื้น	70-80	เปอร์เซ็นต์

2) การทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในระดับโรงเรือน

ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 (WP/CS-XS) ในสภาวะโรงเรือน โดยดำเนินการทดสอบในช่วงเดือนเมษายน-กรกฎาคม พ.ศ. 2561 สถานที่ในการทดสอบสภาวะโรงเรือน คือ หมู่บ้านโพนละออมน้อย ตำบลหนองกุง อำเภอแกดำ จังหวัดมหาสารคาม โดยออกแบบสภาวะการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูปในระดับโรงเรือนเป็น 6 กรรมวิธีทดสอบ โดยทำการทดสอบในโรงเรือนที่มีขนาด 2 เมตร x 1.5 เมตร x 2 เมตร มีรายละเอียดแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูปในระดับโรงเรือน

โรงเรือนทดสอบ	**กรรมวิธีทดสอบ**
1 โรงเรือนควบคุม	เห็ดขอนขาว 300 ก้อน
2 โรงเรือนควบคุม	1. เห็ดขอนขาว 300 ก้อน 2. ไรไข่ปลา 2,000 ตัวต่อเห็ดขอนขาว 1 ก้อน
3 ฉีดพ่นสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดก่อน การแพร่ระบาดของไรไข่ปลา	1. เห็ดขอนขาว 300 ก้อน 2. ฉีดพ่นสารคาร์บาริล 300 มิลลิลิตรต่อโรงเรือน 3. ไรไข่ปลา 2,000 ตัวต่อเห็ดขอนขาว 1 ก้อน (นำไรไข่ปลาลงในก้อนเห็ดหลังการฉีดพ่นสารคาร์บาริล)
4 ฉีดพ่นสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดหลัง การแพร่ระบาดของไรไข่ปลา	1. เห็ดขอนขาว 300 ก้อน 2. ไรไข่ปลา 2,000 ตัวต่อเห็ดขอนขาว 1 ก้อน (นำไรไข่ปลาลงในก้อนเห็ดก่อนการฉีดพ่นสารคาร์บาริล 3 วัน) 3. ฉีดพ่นสารคาร์บาริล 300 มิลลิลิตรต่อโรงเรือน
5 ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปก่อน การแพร่ระบาดของไรไข่ปลา	1. เห็ดขอนขาว 300 ก้อน 2. ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป 10 ลิตรต่อโรงเรือน 3. ไรไข่ปลา 2,000 ตัวต่อเห็ดขอนขาว 1 ก้อน (นำไรไข่ปลาลงในก้อนเห็ดหลังการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป)
6 ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป หลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา	1. เห็ดขอนขาว 300 ก้อน 2. ไรไข่ปลา 2,000 ตัวต่อเห็ดขอนขาว 1 ก้อน (นำไรไข่ปลาลงในก้อนเห็ดก่อนการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป 3 วัน) 3. ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป 10 ลิตรต่อโรงเรือน

หมายเหตุ : โรงเรือน 2-6 ใช้ไรไข่ปลาเพศเมียที่ออกจากท้องแม่อายุประมาณ 1 วัน ในการทดสอบ
รดน้ำวันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) ระยะห่างระหว่างโรงเรือน 5 เมตร
โรงเรือน 3-4 ฉีดพ่นสารเคมีคาร์บาริลความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จำนวน 2 ครั้งต่อสัปดาห์
โรงเรือน 5-6 ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จำนวน 2 ครั้งต่อสัปดาห์

3) การเก็บบันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ผลทดสอบประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในระดับโรงเรือน

3.1) ค่าอุณหภูมิและค่าความชื้นภายในโรงเรือน

ทำการบันทึกอุณหภูมิและความชื้นภายในโรงเรือนเพาะเห็ดตลอดการทดสอบในช่วงเดือนเมษายน-กรกฎาคม พ.ศ. 2561 โดยติดตั้งเทอร์โมมิเตอร์ประจำแต่ละโรงเรือนและใช้เครื่องวัดค่าความชื้น (thermo-hygrometer) ในการบันทึกค่าความชื้นภายในโรงเรือน

3.2) ผลผลิตเห็ดและค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพ (% biological efficiency; %B.E.)

ทำการเก็บผลผลิตเห็ดขอนขาวในถุงอาหารเพาะเห็ดแต่ละก้อนในแต่ละโรงเรือนทุกวัน โดยทำการชั่งน้ำหนักและบันทึกผลผลิตที่ได้ จากนั้นคำนวณผลผลิตเห็ดขอนขาวต่อก้อน และคำนวณค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพของเห็ด (biological efficiency; %B.E.) ดังสูตร (นันทินี ศรีจุมปา และ ศิรากานต์ ขยันการ, 2553)

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพของเห็ด (biological efficiency; \%B.E.)} = \frac{\text{น้ำหนักดอกเห็ดสด}}{\text{น้ำหนักแห้งวัสดุเพาะ}} \times 100$$

3.3) วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ (proximate analysis) และปริมาณสารเคมีตกค้างในเห็ดขอนขาว

3.3.1) การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการเห็ดขอนขาว (proximate analysis)

นำตัวอย่างเห็ดขอนขาวที่เป็นผลผลิตจากโรงเรือนทดสอบทั้ง 6 โรงเรือนที่ผ่านการอบแห้งและบดเป็นผงมาทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการเปรียบเทียบกัน ได้แก่ ปริมาณความชื้น (moisture) เถ้า (ash) โปรตีนรวม (crude protein; CP) ไขมัน (ether extract; EE) เยื่อใยหยาบ (crude fiber; CF) และคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย (nitrogen free extract; NFE) ตามวิธีการของ AOAC (1990) โดยทำการวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มีขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้

1. การวิเคราะห์ค่าน้ำหนักแห้งและปริมาณเถ้า (dry matter and ash)

1) อบถ้วยอลูมิเนียมในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15-30 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) และนำมาชั่งน้ำหนัก

2) นำตัวอย่างผงเห็ดขอนขาวปริมาณ 2-3 กรัม ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียม แล้วนำมาชั่งน้ำหนักรวมระหว่างถ้วยและตัวอย่าง

3) นำไปอบแห้งในเตาอบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง หรือนาน 1 คืน (อบแห้ง)

4) นำถ้วยอลูมิเนียมจากข้อ 3 มาใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

5) นำถ้วยอลูมิเนียมจากข้อ 4 ไปเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง (อบให้เป็นเถ้า)

6) ทำให้เย็นภายในเตาอบนานอย่างน้อย 8 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น และนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนและทำการคำนวณหาค่าน้ำหนักแห้งและปริมาณเถ้า

$$\text{น้ำหนักแห้ง (เปอร์เซ็นต์; \%DM)} = \frac{(B-A)}{C} \times 100$$

เมื่อ, A = น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียม (กรัม)
B = น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมและตัวอย่าง (กรัม) (หลังอบแห้ง)
C = น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)

$$\text{เถ้า (เปอร์เซ็นต์; \%Ash)} = \frac{(B-A)}{C} \times 100$$

เมื่อ; A = น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียม (กรัม)
B = น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมและตัวอย่าง (กรัม) (หลังอบให้เป็นเถ้า)
C = น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)

2. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (moisture)

1) อบถ้วยอลูมิเนียมในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) นำมาชั่งน้ำหนัก

2) ชั่งตัวอย่างผงเห็ดขอนขาวปริมาณ 3 กรัม ลงในถ้วยอลูมิเนียมที่อบแห้ง และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

3) นำถ้วยอลูมิเนียมที่บรรจุผงตัวอย่างเห็ดขอนขาวเข้าอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง นำมาใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4) นำไปชั่งน้ำหนักอบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ (แตกต่างกันไม่เกิน 2 มิลลิกรัม) และทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

$$\text{ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

เมื่อ; A = น้ำหนักผงเห็ดขอนขาวก่อนการอบ (กรัม)

B = น้ำหนักผงเห็ดขอนขาวหลังการอบ (กรัม)

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (crude protein) โดยวิธี Kjeldahl Method

ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1) ชั่งตัวอย่างผงเห็ดขอนขาวปริมาณ 1 กรัมใส่ลงในกระดาษกรองที่ปราศจากสารไนโตรเจน จากนั้นนำใส่ในขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีน (kjeldahl flask)

2) เติมสารเร่ง (catalyst) 10 เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย

3) เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (concentrated H_2SO_4) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

4) นำไปย่อยด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส จนสารละลายในขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนใส

ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

1) เมื่อตัวอย่างที่ผ่านการย่อยเย็นลงแล้ว ให้เติมน้ำไร้ประจุ (deionized water) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

2) ต่อขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่นที่มีขวดปากแคบวัดปริมาตร ซึ่งมีกรดบอริก (boric acid solution) ปริมาตร 75 มิลลิลิตร โดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริก

3) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (50% NaOH) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนโดยทำการเติมอย่างช้าๆ จนสารละลายมีสีดำ

4) ใส่อินดิเคเตอร์ในกรดบอริก 2-3 หยด

5) ทำการกลั่นไปเรื่อยๆ จนไม่มีก๊าซแอมโมเนีย แล้วทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที สังเกตปริมาตรของเหลวที่ได้จากการกลั่นในขวดปากแคบให้มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร ล้างปลายเครื่องกลั่นด้วยน้ำกลั่น แล้วนำขวดปากแคบออกจากเครื่องกลั่น

ขั้นตอนการไตเตรต (titration)

นำสารละลายที่กลั่นได้มาไตเตรตด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล (0.1 N HCl) ทำการไตเตรตจนถึงจุดยุติพร้อมบันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรต แล้วคำนวณปริมาณโปรตีน

$$\text{ไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์; N\%)} = \frac{1.401 \times (A-B) \times (M\ (mol/L)HCl)}{\text{น้ำหนักแห้งตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ; A = ปริมาตร HCl ที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตร HCl ที่ใช้ไตเตรต blank (มิลลิลิตร)

M = โมลาร์ (mol/L) ของกรด HCl

โปรตีนรวม (เปอร์เซ็นต์; CP%) = 6.25 x N (%)

4. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Ether extract or crude fat determination)

1) นำตัวอย่างผงเห็ดขอนขาวปริมาณ 2 กรัม ที่ผ่านการหาความชื้นแล้วใส่ลงบนกระดาษกรองห่อให้มิดชิดและใส่ลงในทิมเบิล

2) นำทิมเบิลใส่ใน extraction unit it of soxhlet ซึ่งเชื่อมต่อกับ 1046 service unit โดยใช้เครื่อง adapter แล้วนำ extraction cup ไปอบแล้วชั่งนำหนักที่แน่นอน

3) เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในขวดกลั่นที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนปริมาตร 180 มิลลิลิตร ประกอบเครื่อง soxhlet เข้าด้วยกัน

4) ให้ความร้อนทำการสกัดไขมันจากตัวอย่างนานประมาณ 3 - 4 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นจาก condenser มีอัตรา 150 หยดต่อนาที

5) กลั่นเอาปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากไขมัน นำขวดกลั่นและไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก

$$\text{ไขมัน (เปอร์เซ็นต์; \%EE)} = \frac{(B-A)}{W} \times 100$$

เมื่อ; A = น้ำหนักขวดกลั่น (กรัม)

B = น้ำหนักขวดกลั่นและไขมันที่สกัดได้ (กรัม) (หลังการอบแห้ง)

W = น้ำหนักแห้งตัวอย่าง (กรัม)

5. การวิเคราะห์เยื่อใยหยาบ (crude fiber)

1) นำตัวอย่างผงเห็ดขอนขาวปริมาณ 1 กรัม (W1) ที่สกัดเอาไขมันออกแล้วมาหาปริมาณเส้นใย โดยนำตัวอย่างใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร

2) เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1275 โมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที ตลอดเวลาที่ต้มจะต้องรักษาปริมาตรให้คงที่โดยการเติมด้วยน้ำกลั่น

3) กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 54 หรือ 531 โดยใช้ suction ล้างด้วยน้ำร้อนหลายๆ ครั้งจนหมดกรด แล้วเทกากกลับใส่ในบีกเกอร์ใบเดิม

4) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.313 โมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที รักษาปริมาตรให้คงที่โดยการเติมด้วยน้ำกลั่น

5) กรองผ่านกระดาษกรองโดยใช้ suction ล้างด้วยน้ำร้อนหลายๆ ครั้งจนหมดด่างแล้วเทกากกลับใส่ในบีกเกอร์ใบเดิม

6) ล้างกากด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างตามด้วยน้ำร้อนจนหมดกรด

7) นำกากล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร

8) นำกากใส่ลงกระดาษกรอง Whatman ชนิดปราศจากเถ้า เบอร์ 41 ซึ่งผ่านการอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส และชั่งจนทราบน้ำหนักที่แน่นอน (W29)

9) นำตัวอย่างข้อ 8 อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักคงที่

10) จากนั้นนำกากไปเผาให้เป็นเถ้าในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียสจนเป็นเถ้าสีขาว ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งหาน้ำหนักเถ้าที่ได้ (W3) และทำการคำนวณเยื่อใยหยาบ

น้ำหนักเส้นใย (กรัม) = W2-W3

$$\text{เยื่อใย (เปอร์เซ็นต์; \%CP)} = \frac{\text{น้ำหนักเส้นใย (กรัม)}}{W1} \times 100$$

เมื่อ; W1 = น้ำหนักแห้งของกาก (กรัม)
W2 = น้ำหนักแห้งของกาก (กรัม) (หลังการอบแห้ง)
W3 = น้ำหนักเถ้า (กรัม) (หลังการเผา)

6. การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตที่ย่อยง่าย (nitrogen free extract) ทำการคำนวณดังสูตร

คาร์โบไฮเดรต (เปอร์เซ็นต์; %NFE) = % DM - (% EE + % CP + % Ash + % CF)

เมื่อ; DM = น้ำหนักแห้ง
EE = ปริมาณไขมัน
CP = ปริมาณโปรตีน
CF = ปริมาณเยื่อใยหยาบ

3.3.2) การวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีตกค้างในเห็ดขอนขาว

นำตัวอย่างเห็ดขอนขาวที่ได้จากโรงเรือนทดสอบทั้ง 6 โรงเรือนที่ผ่านการอบแห้งและบดเป็นผงปริมาณ 500 กรัม มาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารเคมีตกค้างในเห็ด ได้แก่ สารคาร์บาริล (carbaryl) ซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมต (carbamate) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง liquid chromatography mass spectrometer (LC-MS) โดยทำการวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาขอนแก่น มีสภาวะและขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้

สภาวะเครื่อง LC-MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Column:	**Reverse phase C18**
Flow rate:	0.23 มิลลิลิตรต่อนาที
Injection volume:	5 ไมโครลิตร
Column temperature:	40 องศาเซลเซียส
Mobile phase:	A = 0.01% Formic acid in water
	B = 0.01% Formic acid in methanol
Run time:	20 นาที
Post time:	5 นาที
MS condition	
Ionization mode:	APS-ES (Atmospheric Pressure Ionization-Electrospray)
Polarity:	Positive
Spray chamber	
Drying gas temperature:	315 องศาเซลเซียส
Drying gas:	12.50 ลิตรต่อนาที
Capillary voltage:	4000 โวลต์
Mass analyzer	
Sim parameters:	Signal 1 (Target Ion for Quantitative Analysis)

การสกัดตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

1) ทำการสกัดตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ โดยชั่งตัวอย่างผงเห็ดขอนขาวปริมาณ 25 กรัม แล้วเติมตัวทำละลายอะซีโตน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์ ปริมาณ 10 กรัม จากนั้นทำการสกัดตัวอย่างโดยใช้เครื่อง homogenizer ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายใส

2) เทสารละลายส่วนใสลงในขวดเตรียมตัวอย่างที่มีโซเดียมซัลเฟต ปริมาณ 15 กรัม ปิดฝาขวดตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที โดยทำการเขย่าเบาๆ

3) ทำการกรองสารละลายผ่านโซเดียมซัลเฟต ปริมาณ 20 กรัม โดยใช้กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 100 มิลลิลิตร รองรับให้ได้ปริมาตรสารที่กรอง 50

มิลลิลิตร จากนั้นเทสารละลายที่ได้ลงใน round bottom flask ขนาด 100 มิลลิลิตร และนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่สภาวะอุณหภูมิของอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส ทำการระเหยจนตัวอย่างเกือบแห้ง

4) ดูดตัวอย่างที่ผ่านการระเหยจนเกือบแห้งลงใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการละลาย residues โดยใช้หลอดหยดดูดสารเอทิลอะซีเตตลงใน round bottom flask และทำการฉีดล้างด้านข้างของ round bottom flask เพื่อให้ได้ปริมาณสารมากที่สุดจากนั้นถ่ายสารละลายที่ได้ลงใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตรเดิม

5) ปรับปริมาตรสารละลายในข้อ 4 ด้วยสารเอทิลอะซีเตตให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการแบ่งสารละลายมา 2 มิลลิลิตร นำไปเป่าให้แห้งด้วยเครื่อง N-evaporator

6) ทำการผสมสารละลาย 0.01% formic acid: 1% methanol : dichloromethane 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี

7) ทำการ clean up ตัวอย่างด้วย SPE-NH_2

7.1) ทำการ pre-wash SPE-NH2 ด้วย dichloromethane 5 มิลลิลิตร ปล่อยสารละลายทิ้ง

7.2) เติม 0.01% formic acid: 1% Methanol: dichloromethane 5 ml และปล่อยสารละลายทิ้ง

7.3) ดูดสารละลายจากข้อ 6 ใส่ลงใน SPE-NH_2 เก็บสารละลายไว้ในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร

7.4) เติม 0.01% formic acid : 1% methanol : dichloromethane 4 ml ลงในหลอดทดลอง แล้วทำการผสมให้เข้ากันดี จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ลงใน SPE-NH2

7.5) ทำตามขั้นตอนในข้อ 7.4 อีกครั้ง จากนั้นเติม dichloromethane 4 มิลลิลิตร อีกครั้งและเก็บสารละลายทั้งหมด

8) นำสารละลายที่ได้ไปลดปริมาตรด้วยเครื่อง N-evaporator จนแห้ง แล้วเติมสารละลาย 0.01% formic acid in methanol : DI (1:1) 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำการ sonicate นาน 1 นาที

9) ถ่ายสารละลายที่ได้ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์หาสารคาร์บาริลด้วยเครื่อง LC-MS

3.3 รูปแบบของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง โดยมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูปแต่ละชนิด คุณค่าทางโภชนาการเห็ดขอนขาว จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One – way Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่โดยใช้ LSD test ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SAS (1990) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปราย

4.1 ผลการพัฒนารูปแบบแบคทีเรียร่วมอาศัยในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Xenorhabdus stockiae* PB09 เพื่อควบคุมไรศัตรูเห็ด (*Luciaphorus perniciosus* Rack) ในระดับห้องปฏิบัติการ

4.1.1 รูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่เหมาะสมในการทำลายไรไข่ปลา

1. ประสิทธิภาพแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 รูปแบบต่างๆ ในการทำลายไรไข่ปลา

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบต่างๆ จำนวน 3 รูปแบบ ได้แก่ แบบผงละลายน้ำ (wettable powder; WP) แบบน้ำเซลล์แขวนลอย (liquid cell pellet; LC) และแบบน้ำส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ (liquid supernatant; LS) วัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เหมาะสมในการทำลายไรไข่ปลา โดยทำการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v หรือ v/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงบนเส้นใยเห็ดขอนขาว และทำการตรวจสอบการตายของไรไข่ปลาทุกวันเป็นเวลา 5 วัน หลังการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบต่างๆ แสดงผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 รูปแบบต่างๆ

แบคทีเรียสำเร็จรูป	อัตราการตายของไรไข่ปลา				
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
แบบผง WP	64.10±3.41^{cB}	87.76±2.35^{bA}	90.25±3.33^{aA}	90.25±3.33^{aA}	90.25±3.33^{aA}
แบบน้ำ LC	69.58±2.47^{bB}	85.83±4.85^{bAB}	86.50±13.47^{aA}	86.50±13.47^{aA}	86.50±13.47^{aA}
แบบน้ำ LS	72.58±2.67^{bC}	88.16±2.36^{bB}	92.78±3.85^{aA}	92.78±3.85^{aA}	92.78±3.85^{aA}
Propargite	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}
LB broth	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{cA}	0.00±0.00^{bA}	0.00±0.00^{bA}	0.00±0.00^{bA}

หมายเหตุ: WP คือ wettable powder (1% w/v); LC คือ liquid cell pellet (1% v/v); LS คือ liquid supernatant (1% v/v); สารเคมีกำจัดไร propargite (0.04% w/v)

^{abcd} อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

^{ABC} อักษรที่กำกับในแนวนอนที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 รูปแบบต่างๆ จำนวน 3 สูตร พบว่าอัตราการตายของไรไข่ปลามีค่าเพิ่มขึ้นหลังการทดสอบและมีค่าสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยในวันที่ 1 สารเคมีฆ่าไร (propargite) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และในกลุ่มของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบน้ำ LS ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาสูงสุดเท่ากับ 72.58 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LC คือ 69.58 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงละลายน้ำ WP และอาหารเหลว LB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับในวันที่ 2 พบว่าสารเคมีฆ่าไรส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกันกับวันที่ 1 ส่วนกลุ่มของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 3 รูปแบบ ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาในช่วง 85.83-88.16 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LS ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาสูงสุดเท่ากับ 88.16 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบอื่นๆ และในวันที่ 3 ของการทดลองพบว่าสารเคมีฆ่าไรยังคงส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกลุ่มแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LS ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาสูงสุดเท่ากับ 92.78 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบอื่นๆ (86.50-90.25 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และไม่พบการตายของไรไข่ปลาเมื่อทดสอบด้วยอาหารเหลว LB นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่าอัตราการตายของไรไข่ปลาในวันที่ 3 จะมีค่าคงที่ถึงวันที่ 5 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ใช้เวลาในการฆ่าไรได้สูงสุด 3 วันหลังการฉีดพ่น โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 3 รูปแบบ มีอัตราการตายของไรไข่ปลาเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 เป็น 0.24-0.41 เท่า โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 รูปแบบน้ำ LS ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาสูงสุด (92.78 เปอร์เซ็นต์) เนื่องจากสารเมตาบอไลท์ส่วนใหญ่ที่มีฤทธิ์ในการทำลายไรไข่ปลานั้นจะอยู่ในส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ (cell-free supernatant) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bussaman et al. (2012) ที่พบว่าส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ของแบคทีเรีย *X. stockiae* ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาสูงที่สุด (89.00 เปอร์เซ็นต์) และมีจำนวนลูกไรไข่ปลาต่ำที่สุด (จำนวนไข่ 41.33 ใบต่อไรเพศเมีย 1 ตัว) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์แขวนลอย (cell suspension) และส่วนสกัดจากเซลล์ (crude cell extract) เพราะในส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ของแบคทีเรียนั้นจะมีส่วนของสารเมตาบอไลท์ที่แบคทีเรียผลิตเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ เอนไซม์ และสารปฏิชีวนะต่างๆ ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายไรไข่ปลาโดยตรง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ของแบคทีเรีย *X. nematophila* มีประสิทธิภาพในการทำลายแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดภายใน

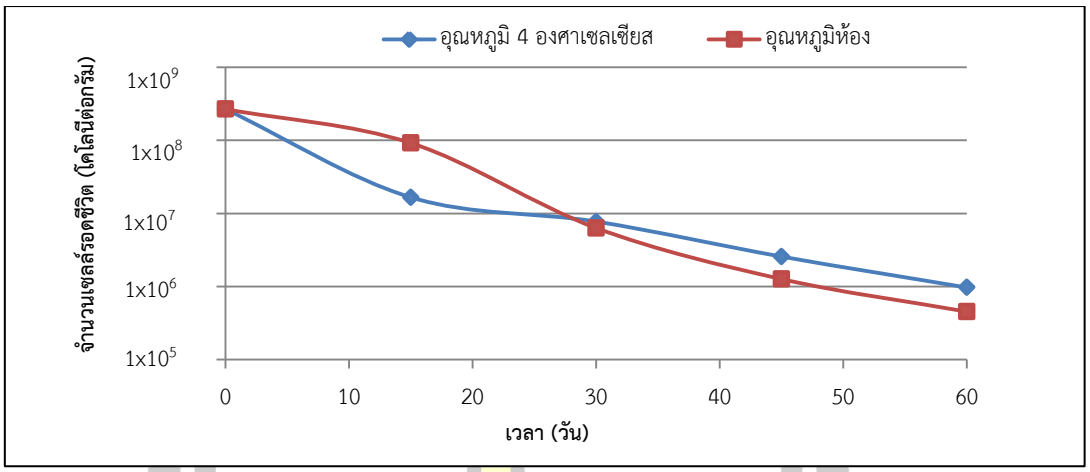
48 ชั่วโมง ได้แก่ หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* Hübner) หนอนกินใยผัก (*Plutella xylostella* L.) และหนอนตั๊กแตนทะเลทราย (*Schistocerca gregaria* Forsk) (Mahar et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการทำลายหนอนกินรังผึ้งสูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบด้วยส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ที่ได้จากเซลล์ที่มีความเข้มข้น 4×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Mahar et al., 2005) โดยสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ผลิตได้จากกลุ่มแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะมีฤทธิ์ในการทำลายแมลงศัตรูพืชในระดับสูง ซึ่งมีการจำแนกชนิดของสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิกลุ่มดังกล่าวซึ่งประกอบด้วย สารพิษ toxin complexes (T_C) เอนไซม์กลุ่ม hydrolytic enzymes ได้แก่ เอนไซม์ไคติเนส (chitinase) โปรตีเนส (protease) ไลเพส (lipase) และสารปฏิชีวนะ xenorhabdins, xenorxides และ xenocoumacins (Bode, 2009; Forst et al., 1997; Sheets et al., 2011) ซึ่งสารกลุ่มดังกล่าวนี้จะส่งผลโดยตรงต่อระบบภูมิคุ้มกันและฮอร์โมนของแมลง (Owuama, 2001)

2. ความคงตัวของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 รูปแบบต่างๆ ในการทำลายไรไข่ปลา

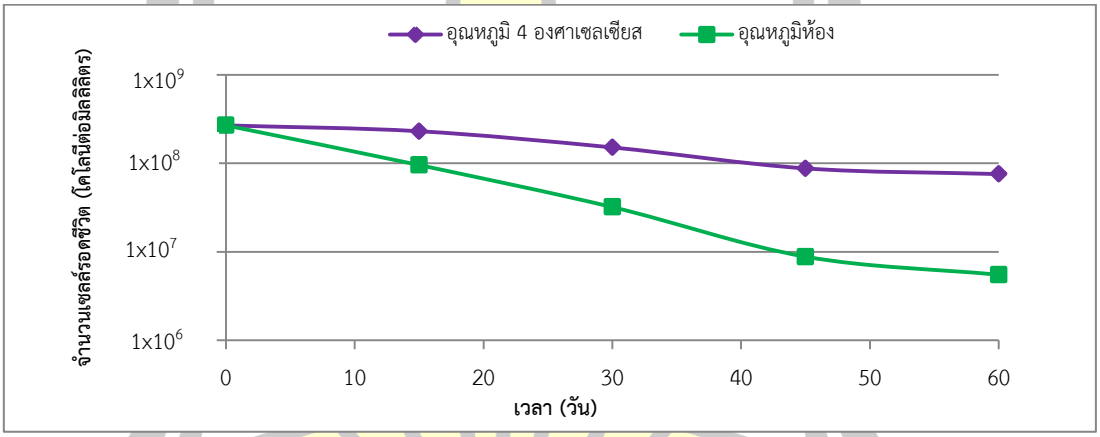
2.1 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในแบคทีเรียสำเร็จรูป

การศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในแบคทีเรียสำเร็จรูป 2 รูปแบบ ได้แก่ แบบผงละลายน้ำ (WP) และแบบน้ำเซลล์แขวนลอย (LC) ส่วนแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ (LS) ไม่มีส่วนผสมของเซลล์เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย จึงไม่ได้ทำการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรีย โดยเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ระยะเวลาต่างๆ (0, 10, 15, 30, 45 และ 60 วัน) ที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ผลการทดลองแสดงในภาพประกอบที่ 6 และ 7

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว



ภาพประกอบที่ 6 จำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิตในแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP (wettable powder) ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน



ภาพประกอบที่ 7 จำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิตในแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LC (liquid cell pellet) ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิระยะเวลาต่างกัน

การเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ทั้ง 2 รูปแบบ (WP และ LC) ที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน พบว่าจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิตในแบคทีเรียสำเร็จรูปมีแนวโน้มลดลง โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงละลายน้ำ WP มีจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษา 0-60 วัน ที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ในช่วง 2.68×10^{8}-9.66×10^{5} และ 2.68×10^{8}-4.51×10^{5} โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาแบคทีเรีย

สำเร็จรูปนาน 60 วัน พบว่าจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิตมีจำนวนลดลงเท่ากับ $9.66x10^5$ และ $4.51 x10^5$ โคโลนีต่อกรัม ที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LC ที่พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น (60 วัน) เซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตมีจำนวนลดลง โดยจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในแบคทีเรียสำเร็จรูป LC ที่เก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) มีปริมาณลดลงจากปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ $2.68x10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ลดลงเหลือเท่ากับ $7.75x10^7$ และ $5.50x10^6$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาเก็บรักษา 60 วัน (ภาพประกอบที่ 7) จากผลการทดลองเห็นได้ว่าที่สภาวะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิตในแบคทีเรียสำเร็จรูป WP และแบบน้ำ LC มีปริมาณสูงกว่าสภาวะเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) แสดงให้เห็นว่าที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 โดยเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิตในแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LC มีปริมาณสูงกว่าในแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงละลายน้ำ WP เนื่องจากในขั้นตอนการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงละลายน้ำ WP ต้องผ่านกระบวนการการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้ส่วนผสมของแบคทีเรียสำเร็จรูปแห้งและผ่านขั้นตอนการปั่นเพื่อให้มีอนุภาคเล็กลงด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าซึ่งมีความร้อนเกิดขึ้นจึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้จำนวนเซลล์แบคทีเรียมีปริมาณลดลงจากจำนวนเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้น ส่วนแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LC ที่มีแนวโน้มจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตที่สูงกว่าเนื่องจากมีส่วนผสมของ Tween 20 ซึ่งเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์เช่นเดียวกับกลีเซอรอลรวมถึงน้ำตาลที่มีคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์แบคทีเรีย จึงทำให้แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LC สามารถคงสภาพและมีอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่สูงขึ้นในสภาวะเครียดต่างๆ เช่น ความเครียดจากความดันออสโมติกและอุณหภูมิ (Fillinger et al., 2001) และยังช่วยคงปริมาณน้ำและปกป้องเซลล์จาก สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ (Manikandan et al., 2010)

2.2 ความคงตัวของประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09

ประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผงละลายน้ำ WP แบบน้ำ LC และแบบน้ำ LS ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 0, 15, 30, 45 และ 60 วัน ในสภาวะอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาความคงตัวของแบคทีเรียสำเร็จรูปแต่ละชนิด โดยทำการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ทั้ง 3 รูปแบบ ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v หรือ

v/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงบนเส้นใยเห็ดขอนขาว และตรวจสอบการตายของไรไข่ปลาหลังการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบต่างๆ นาน 3 วัน (อัตราการตายไรไข่ปลาสูงสุดและคงที่) แสดงผลดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 อัตราการตายของไรไข่ปลาหลังทดสอบด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	Mite mortality				
	วันที่ 0	วันที่ 15	วันที่ 30	วันที่ 45	วันที่ 60
แบบผง WP/4°C	90.33±0.83^{abA}	84.44±4.01^{bAB}	80.00±3.33^{bBC}	72.33±2.46^{bCD}	68.08±1.39^{bD}
แบบน้ำ LC/4°C	85.42±6.64^{bA}	83.33±0.23^{bAB}	75.56±4.01^{bBC}	72.22±2.94^{bBC}	65.44±1.73^{bC}
แบบน้ำ LS/4°C	92.94±1.60^{abA}	88.33±1.67^{bAB}	75.56±8.68^{bBC}	70.00±6.94^{bBC}	62.08±1.73^{cdC}
แบบผง WP/RT	90.33±0.83^{abA}	81.11±2.94^{bB}	71.11±2.94^{bcC}	63.08±1.76^{bD}	59.38±1.53^{dD}
แบบน้ำ LC/RT	85.42±6.64^{bA}	84.33±1.17^{bAB}	75.56±4.84^{bBC}	67.78±4.84^{bC}	61.83±0.82^{cdC}
แบบน้ำ LS/RT	92.94±1.60^{abA}	83.33±3.33^{bAB}	72.22±4.84^{bBC}	63.33±8.39^{bCD}	52.17±1.58^{dD}
Propargite	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}
LB broth	0.00±0.00^{cA}	0.00±0.00^{cA}	0.00±0.00^{cA}	0.00±0.00^{cA}	0.00±0.00^{eA}

หมายเหตุ: WP คือ wettable powder (1% w/v); LC คือ liquid cell pellet (1% v/v); LS คือ liquid supernatant (1% v/v); สารเคมีกำจัดไร propargite (0.04% w/v)

^{abcde} อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

^{ABC} อักษรที่กำกับในแนวนอนที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ความคงตัวของประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ทั้ง 3 รูปแบบ ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า มีแนวโน้มของอัตราการตายของไรไข่ปลาที่ลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษา ดังแสดงในตารางที่ 11 โดยที่สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 วัน แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP แบบน้ำ LC และแบบน้ำ LS ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาเท่ากับ 68.08-90.33, 65.44-85.42 และ 62.08-92.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP และแบบน้ำ LC ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาที่สูงกว่าแบบน้ำ LS โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 3 รูปแบบ ที่เก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 วัน ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาลดลง 0.23-0.33 เท่า โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LS ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาลดลงมากที่สุดในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 0-15 วัน แบคทีเรียสำเร็จรูปที่เก็บรักษาที่สภาวะ

อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาที่ต่ำกว่าสภาวะการเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP แบบน้ำ LC และแบบน้ำ LS ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) นาน 60 วัน ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาเท่ากับ 59.38-90.33, 61.83-85.42 และ 52.17-92.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LC ที่ผ่านการเก็บรักษานาน 60 วัน ที่สภาวะอุณหภูมิห้องส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาที่สูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP และแบบน้ำ LS แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 3 รูปแบบที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาลดลง 0.30-0.44 เท่า และแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LS ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาที่ลดลงมากที่สุด (ตารางที่ 11) จากผลการทดลองเห็นได้ว่าสภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ทั้ง 3 รูปแบบมากกว่าสภาวะอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เนื่องจากที่สภาวะอุณหภูมิต่ำ (4-5 องศาเซลเซียส) เป็นสภาวะอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ส่งผลดีต่อเซลล์แบคทีเรียในแบคทีเรียสำเร็จรูป เพราะจะช่วยคงสภาพเซลล์และปริมาณสารอาหารในส่วนประกอบที่ใช้ผลิตสูตรทำให้เซลล์แบคทีเรียมีอัตราการรอดชีวิตที่สูง และแบคทีเรียมีกระบวน การเมตาบอลิซึมและกิจกรรมทางสรีรวิทยาภายในเซลล์ที่ลดลง (Phiromtan, Mala and Srinives, 2013) และยังช่วยคงสภาพของน้ำตาลและน้ำมันพืชที่ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตสูตร ซึ่งส่วนประกอบดังกล่าวมีส่วนช่วยในการปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ (Lee et al., 2006) แม้ว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LS จะส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาสูงสุด แต่มีอายุการเก็บรักษาที่สั้นซึ่งไม่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP และแบบน้ำ LC เป็นแบคทีเรียสำเร็จรูปที่มีความเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้เนื่องจากมีอัตราการตายไรไข่ปลาที่สูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LS ทั้งที่สภาวะการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LS ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน มีอัตราการตายของไรไข่ปลาที่ต่ำ อาจเกิดจากสารเมตาบอไลท์ในส่วนใสที่ผ่านการกรองเซลล์ (cell-free supernatant) ของแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LS มีความคงตัวต่ำและไม่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ขณะที่แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP และแบบน้ำ LC มีความคงตัวสูงกว่า เนื่องจากส่วนผสมในการผลิตสูตรดังกล่าวจะประกอบด้วยเซลล์แบคทีเรียซึ่งยังมีการเจริญโดยการแบ่งเซลล์พร้อมทั้งมีการสร้างสารเมตาบอไลท์ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ตลอดเวลา จึงส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาที่สูงกว่าแบบน้ำ LS และในแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP และแบบน้ำ LC มีส่วนผสมในการผลิตสูตรที่ประกอบด้วยแป้งข้าวโพดที่ช่วยในเรื่องของการปกป้องเซลล์และส่งเสริมการยึดเกาะบนผิวพืช (เส้นใยเห็ด) ของเซลล์

แบคทีเรีย และน้ำมันมะกอกมีส่วนช่วยเพิ่มความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียในแบคทีเรียสำเร็จรูป (Fravel, Connick and Lewis, 1998) โดยส่วนผสมในการผลิตสูตรแบคทีเรียสำเร็จรูปในส่วนที่เป็นแป้งข้าวโพดเมื่อทำปฏิกิริยา กับความร้อนจะเกิดการเจลาติไนซ์ (gelatinization) และเกิดโครงสร้างเป็นแบบ cross-linked structure สามารถปกป้องเซลล์แบคทีเรีย (coat) จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และส่งผล ทำให้เซลล์แบคทีเรียในแบคทีเรียสำเร็จรูปสามารถเกาะติดกับพื้นผิวของพืชทดสอบ (เส้นใยเห็ดขอนขาว) ได้ดีขึ้น (Burges and Jones, 1998) นอกจากนี้น้ำมันมะกอกและน้ำตาลซูโครสที่เป็นส่วนผสมในการผลิตสูตรแบคทีเรียยังสามารถเป็นแหล่งอาหารให้กับแบคทีเรียและควบคุมปริมาณน้ำอิสระที่เหมาะสมในแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP ได้ (Lee et al., 2006) เช่นเดียวกันกับแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LC ที่มีส่วนประกอบของแป้งข้าวโพด (corn starch) เป็นตัวช่วยในการยึดเกาะพื้นผิววัตถุของแบคทีเรียและปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากแสงได้ด้วย นอกจากนี้ Gasic and Tanovic (2013) รายงานว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP เป็นแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบแห้ง ซึ่งปัจจุบันมีการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปชีวภาพในรูปแบบดังกล่าวอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความคงตัวในการเก็บรักษา ผสมกับน้ำได้ง่ายและสะดวกต่อการนำไปใช้โดยการใช้เครื่องพ่นต่างๆ เช่นเดียวกันกับแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LC ที่นิยมผลิตเพราะมีขั้นตอนที่ง่าย สะดวกต่อการประยุกต์ใช้ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องของการเก็บรักษา ดังรายงานการวิจัยของ Lee et al. (2006) ที่ได้ศึกษาการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP ของแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* N1 โดยมีส่วนประกอบ เป็นแป้งข้าวโพด (corn starch) น้ำมันมะกอก (olive oil) และน้ำตาลซูโครส (sucrose) ในการควบคุมเชื้อรา *Botrytis cinerea* สาเหตุของโรคราสีเทาในมะเขือเทศและเมื่อทำการทดลองในโรงเรือนด้วยวิธีการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าสามารถควบคุมการเกิดโรคในต้นมะเขือเทศได้ 90.50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารเคมีฆ่าเชื้อราสามารถควบคุมการเกิดโรคได้ 77.00 เปอร์เซ็นต์ และรายงานการวิจัยของ Meng et al. (2015) ที่ทำการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง *B. subtilis* T429 โดยใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียในการผสมสูตร เมื่อเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูปนาน 12 เดือน พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ในนาข้าวที่สูง 77.60-78.50 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันกับการใช้สารเคมี (79.50 เปอร์เซ็นต์) และ Sabaratnam and Traquair (2002) รายงานว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง *Streptomyces* sp. Di-944 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 สัปดาห์ ยังคงมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโคนเน่าในมะเขือเทศที่สูง

จากผลการศึกษารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เหมาะสมในการทำลายไรไข่ปลา จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP ซึ่งมีแนวโน้มความคงตัวของประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาสูงที่สุด เมื่อผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน พร้อมทั้ง

สะดวกต่อการนำไปใช้ มีขั้นตอนการผลิตสูตรที่ไม่ยุ่งยากและมีวิธีการเก็บรักษาที่ง่ายกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปรูปแบบน้ำ ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมในการนำมาพัฒนาแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาในระดับโรงเรือนต่อไป

4.1.2 ผลการพัฒนารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในการทำลายไรไข่ปลา

จากการนำแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผง WP ซึ่งเป็นรูปแบบแบคทีเรียที่เหมาะสม มาพัฒนารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือน โดยทำการแปรผันส่วนประกอบในการผลิตสูตรซึ่งดัดแปลงจากการศึกษาของ Lee et al. (2006) ได้แก่ ความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย สารตัวพา และสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสม มีผลการศึกษา ดังนี้

1. ความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป

1.1 คุณสมบัติแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผลิตจากเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นต่างกัน

คุณสมบัติทางกายภาพ

คุณสมบัติทางกายภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผง WP ที่มีส่วนผสมของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นเซลล์แตกต่างกันจำนวน 4 สูตร ได้แก่ WP/CS-1, WP/CS-2, WP/CS-3 และ WP/CS-4 มีความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียหลังการผสมส่วนประกอบในการผลิตสูตรและอบแห้ง เท่ากับ 2.98×10^{8} , 2.92×10^{7}, 2.63×10^{6} และ 1.57×10^{5} โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ โดยทำการตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าความหนืดของแบคทีเรียสำเร็จรูปหลังกระบวนการผลิตที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลา พบว่าค่า pH ของแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 4 สูตร มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย มีค่า pH ในช่วง 6.65-7.27 โดยค่า pH ของแบคทีเรียสำเร็จรูปจะมีแนวโน้มลดลงตามระดับความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่ผสมในสูตร ซึ่งแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-1 มีค่า pH สูงสุด (7.27) มีฤทธิ์เป็นด่าง เช่นเดียวกันกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่ไม่ได้ผสมส่วนประกอบในการผลิตสูตรมีค่า pH เป็นด่าง (8.45) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 มีการเจริญและผลิตสารเมตาบอไลท์ปลดปล่อยออกมาส่งผลให้อาหารเหลว LB (pH 7.5) ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียมีสภาวะเป็นด่างเพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่อนำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่มีระดับความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียที่สูง (2.98×10^{8} โคโลนีต่อกรัม) มาผลิตสูตรจึงมีค่า pH เป็นด่าง

เช่นเดียวกันกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 4 สูตรที่มีความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียต่างกัน มีแนวโน้มค่า pH ที่ลดลงและมีความแตกต่างกันทางสถิติกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 เนื่องจากในขั้นตอนการผลิตสูตรมีการใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียในการผสมสูตรในปริมาณที่ต่างกัน คือ 1,000, 500, 250 และ 125 มิลลิลิตร เพื่อใช้ผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตร WP/CS-1, WP/CS-2, WP/CS-3 และ WP/CS-4 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ซึ่งค่า pH ของแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 4 สูตร ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีแนวโน้มลดลงตามปริมาตรเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตสูตร โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-4 ที่มีความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียต่ำสุดมีค่า pH ใกล้เคียงกันกับแบคทีเรียสำเร็จรูปชุดควบคุม WP/CS-control ที่ไม่มีเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียเป็นส่วนผสมใน การผลิตสูตร และแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 4 สูตร ที่มีความเข้มข้นเซลล์ที่ต่างกัน ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความหนืดที่ต่ำไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 12) สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับอุปกรณ์ฉีดพ่นสารได้

ตารางที่ 12 คุณสมบัติทางกายภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีความเข้มข้นต่างกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	คุณสมบัติทางกายภาพ	
	ค่า pH	ค่าความหนืด (centipoise)
WP/CS-1	7.27±0.02[b]	1.73±0.17[a]
WP/CS-2	7.00±0.01[c]	1.90±0.08[a]
WP/CS-3	6.86±0.03[c]	1.90±0.08[a]
WP/CS-4	6.65±0.03[d]	1.90±0.08[a]
WP/CS-control	6.46±0.18[e]	1.73±0.17[a]
X. stockiae PB09	8.45±0.04[a]	1.70±0.23[a]

หมายเหตุ: WP/CS-1 คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงมีความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย 2.98×10^8 โคโลนีต่อกรัม
WP/CS-2 คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงมีความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย 2.29×10^7 โคโลนีต่อกรัม
WP/CS-3 คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงมีความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย 2.63×10^6 โคโลนีต่อกรัม
WP/CS-4 คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงมีความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย 1.57×10^5 โคโลนีต่อกรัม
WP/CS-control คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงชุดควบคุม (ไม่มีเซลล์แบคทีเรีย)
[abcde] อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

คุณสมบัติทางชีวภาพ

ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ทั้ง 4 สูตร โดยการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 หลังการผลิตสูตร (อบแห้ง) โดยใช้ความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียเริ่มต้นในการผลิตสูตร 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผลิตได้มีจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิตแตกต่างกันหลังกระบวนการผลิตสูตร โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตร WP/CS-1, WP/CS-2 , WP/CS-3 และ WP/CS-4 มีความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตเท่ากับ $2.98x10^{8}$, $2.92x10^{7}$, $2.63x10^{6}$ และ $1.57x10^{5}$ โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-1 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียสูงสุดเท่ากับ 2.57 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ แบคทีเรียสำเร็จรูปสูตร WP/CS-2 , WP/CS-3 และ WP/CS-4 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 0.25, 0.02 และ 0.0013 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในแบคทีเรียสำเร็จรูป

แบคทีเรียสำเร็จรูป	ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย (โคโลนีต่อกรัม)		
	เซลล์เริ่มต้น (ก่อนการผลิตสูตร)	หลังผลิตสูตร (อบแห้ง)	การรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)
WP/CS-1	$1.16x10^{10}$	$2.98x10^{8}$	2.57
WP/CS-2	$1.16x10^{10}$	$2.92x10^{7}$	0.25
WP/CS-3	$1.17x10^{10}$	$2.63x10^{6}$	0.02
WP/CS-4	$1.22x10^{10}$	$1.57x10^{5}$	0.0013

1.2 ประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีความเข้มข้นเซลล์ต่างกัน

การทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผง WP ที่มีความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียหลังการผลิตสูตรต่างกัน โดยทำการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ทั้ง 4 สูตร ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงบนเส้นใยเห็ดขอนขาว และตรวจสอบการตายของไรไข่ปลาหลังการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตรต่างๆ นาน 5 วัน พบว่าในวันที่ 1 ของการทดลองแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP ทั้ง 4 สูตร ให้ผลการทำลายไรไข่ปลาที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 โดยมีอัตราการตายของไรไข่ปลา 41.11-58.89

เปอร์เซ็นต์ (*X. stockiae* PB09 =51.11 เปอร์เซ็นต์) แบคทีเรียสำเร็จรูปสูตร WP/CS-1 ที่มีความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรีย 2.98x10^8 โคโลนีต่อกรัม มีอัตราการตายของไรไข่ปลาที่สูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตรอื่น และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมสารเคมีฆ่าไร (propargite) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าสารเคมีฆ่าไรสามารถทำลายไรไข่ปลาได้ดีที่สุด คือทำให้ไรไข่ปลาตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับแบคทีเรียสำเร็จรูปทุกสูตร รวมถึงชุดควบคุมอาหารเหลว LB ที่ไม่พบการตายของไรไข่ปลา

ในวันที่ 2 ของการทดลองพบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 4 สูตร และเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 มีแนวโน้มอัตราการตายของไรไข่ปลาเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 เป็น 0.042-0.30 เท่า โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-1 มีแนวโน้มในการทำลายไรไข่ปลาได้สูงสุด 63.33 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปอื่นๆ และเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย (53.24 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมสารเคมีฆ่าไร พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปทุกสูตรมีอัตราการตายของไรไข่ปลาที่ต่ำกว่า โดยสารเคมีฆ่าไร (propargite) สามารถทำลายไรได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมอาหารเหลว LB ไม่สามารถฆ่าไรได้

ในวันที่ 3 ของการทดลองพบว่าเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 และแบคทีเรียสำเร็จรูปทุกสูตรให้ผลอัตราการตายของไรไข่ปลาที่เพิ่มขึ้นจากวันที่ 2 ของการทดลอง ซึ่งเป็นอัตราการทำลายไรไข่ปลาสูงสุดและคงที่จนถึงวันที่ 5 โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-1 มีอัตราการตายของไรไข่ปลาสูงสุด 75.56 เปอร์เซ็นต์สูงกว่าเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย (62.22 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 และแบคทีเรียสำเร็จรูปมีอัตราการตายของไรไข่ปลาเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 เป็น 0.22-0.45 เท่า ซึ่งในแบคทีเรียสำเร็จรูปจะมีส่วนผสมที่เป็นน้ำตาลและน้ำมันมะกอกซึ่งมีคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์แบคทีเรียให้คงสภาพและทนต่อสภาวะเครียดต่างๆ ได้ และน้ำตาลยังเป็นแหล่งคาร์บอนที่เซลล์แบคทีเรียสามารถนำมาใช้ในการเจริญได้ (Fillinger et al., 2001; Lee et al., 2006) สารเคมีฆ่าไรสามารถฆ่าไรได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมอาหารเหลว LB ไม่พบการตายของไรไข่ปลา (ตารางที่ 14) จากผลการทดลองเห็นได้ว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แต่ละสูตรไม่สามารถทำให้ไรไข่ปลาตายเพิ่มขึ้นหลังวันที่ 3 ของการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียใช้เวลาในการฆ่าไรได้สูงสุด 3 วันหลังการฉีดพ่น เช่นเดียวกันกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่ไม่ได้ผสมส่วนประกอบในการผลิตสูตร และแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-1 มีอัตราการทำลายไรไข่ปลาสูงที่สุดในกลุ่มแบคทีเรียสำเร็จรูปด้วยกัน แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียที่เหมาะสมในการนำมาผลิตรูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 คือ เซลล์แขวนแบคทีเรียความเข้มข้น 2.98x10^8 โคโลนีต่อกรัม ดังรายงานการวิจัยของ Bussaman et al. (2009) ศึกษาประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. nematophila* (X1) ที่ระดับความเข้มข้น

เซลล์ต่างกัน (1x10^{4}-1x10^{10} เซลล์ต่อมิลลิตร) พบว่าประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลามีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย โดยที่ความเข้มข้นเซลล์ 1x10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถทำลายไรไข่ปลาสูงสุด 85.00 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียร่วมอาศัยในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Photorhabdus luminescens* spp. laumondii GPS12 ความเข้มข้นเซลล์แขวนลอย 1x10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาสูงสุด 76 เปอร์เซ็นต์ (Bussaman, Sermswan and Grewal, 2006) ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตร WP/CS-1 ซึ่งมีความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียสูงสุด (2.98x10^{8} โคโลนีต่อกรัม) ไปทำการศึกษาชนิดของสารตัวพาที่เหมาะสมในการพัฒนาแบคทีเรียสำเร็จรูปต่อไป

ตารางที่ 14 อัตราการตายของไรไข่ปลาหลังทดสอบด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่มีความเข้มข้นเซลล์ต่างกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	อัตราการตายของไรไข่ปลา (เปอร์เซ็นต์)				
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
CS	51.11±6.85^{bcB}	53.24±15.03^{bB}	62.22±11.71^{bcA}	62.22±11.71^{bcA}	62.22±11.71^{bcA}
WP/CS-1	58.89±8.39^{bC}	63.33±3.33^{bB}	75.56±8.39^{bA}	75.56±8.39^{bA}	75.56±8.39^{bA}
WP/CS-2	42.22±8.39^{cC}	47.78±13.42^{bB}	61.11±9.62^{bcA}	61.11±9.62^{bcA}	61.11±9.62^{bcA}
WP/CS-3	45.56±13.86^{bC}	50.00±16.67^{bB}	65.56±18.95^{bcA}	65.56±18.95^{bcA}	65.56±18.95^{bcA}
WP/CS-4	41.11±8.39^{cC}	53.33±5.77^{bB}	56.67±5.77^{cA}	56.67±5.77^{cA}	56.67±5.77^{cA}
WP/CS-control	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{cA}	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{dA}
Propargite	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}

หมายเหตุ: CS คือ เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ความเข้มข้นเซลล์ 2.08x10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร
WP/CS-1 คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงความเข้มข้นของเซลล์ 2.98x10^{8} โคโลนีต่อกรัม (ความเข้มข้น 1% w/v)
WP/CS-2 คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงความเข้มข้นของเซลล์ 2.29x10^{7} โคโลนีต่อกรัม (ความเข้มข้น 1% w/v)
WP/CS-3 คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงมีความเข้มข้นของเซลล์ 2.63x10^{6} โคโลนีต่อกรัม (ความเข้มข้น 1% w/v)
WP/CS-4 คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงมีความเข้มข้นของเซลล์ 1.57x10^{5} โคโลนีต่อกรัม (ความเข้มข้น 1% w/v)
WP/CS-control คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงชุดควบคุม (อาหารเหลว LB) (ความเข้มข้น 1% w/v)
สารเคมีกำจัดไร propargite ความเข้มข้น 0.04 % w/v
^{abcd} อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05
^{ABC} อักษรที่กำกับในแนวนอนที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

2. สารตัวพาที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป

2.1 คุณสมบัติแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผลิตจากสารตัวพาต่างชนิดกัน

คุณสมบัติทางกายภาพ

ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผง WP ที่มีความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่เหมาะสมในช่วง 10^8 โคโลนีต่อกรัม โดยทำการแปรผันสารตัวพาต่างชนิดกันจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ แป้งข้าวโพด (corn starch; C) แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch; Ca) แป้งข้าวเจ้า (rice flour; RF) ผงทัลคัม (talcum; T) และดินขาว (kaolinite; K) โดยตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าความหนืด และความชื้นของแบคทีเรียสำเร็จรูปหลังกระบวนการผลิตที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลา พบว่าค่า pH ของแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 5 สูตร มีค่าที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่า pH ในช่วง 7.27-7.56 ขณะที่แบคทีเรียสำเร็จรูปชุดควบคุม (WP/CS-control) ที่ไม่มีส่วนผสมของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียมีค่า pH ต่ำสุด (6.46) เช่นเดียวกันกับค่าความหนืดมีค่าในช่วง 1.73-1.92 centipoise ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทั้งแบคทีเรียสำเร็จรูปและชุดควบคุม เห็นได้ว่าสารตัวพาทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปมีค่า pH และค่าความหนืดของสารละลายที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และเป็นค่าที่อยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐานของสารกำจัดศัตรูพืช ส่วนค่าความชื้นของแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP ที่ผลิตจากสารตัวพาต่างชนิดกัน พบว่ามีค่าความชื้นในช่วง 10.10-14.30 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-C ที่ใช้แป้งข้าวโพดเป็นสารตัวพามีค่าความชื้นสูง (14.30 เปอร์เซ็นต์) ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารตัวพา (WP/CS-C = 12.90 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่แบคทีเรียสำเร็จรูปที่ใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นสารตัวพา (WP/CS -RF) มีค่าความชื้นที่ต่ำ 11.90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ใช้ผงทัลคัม (WP/CS-T = 10.10 เปอร์เซ็นต์) และดินขาว (WP/CS-K = 11.00 เปอร์เซ็นต์) เป็นสารตัวพา โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตรควบคุม WP/CS-control มีค่าความชื้นสูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 15

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 15 คุณสมบัติทางกายภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผลิตจากสารตัวพาต่างชนิดกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	คุณสมบัติทางกายภาพ		
	ค่า pH	ความหนืด (centipoise)	ค่าความชื้น (เปอร์เซ็นต์)
WP/CS -C	7.27±0.02[a]	1.73±0.17[a]	14.30±0.15[a]
WP/CS -Ca	7.10±0.01[a]	1.90±0.08[a]	12.90±0.07[a]
WP/CS -RF	7.68±0.03[a]	1.90±0.08[a]	11.90±0.09[b]
WP/CS -T	7.65±0.03[a]	1.88±0.05[a]	10.10±0.10[b]
WP/CS -K	7.56±0.03[a]	1.92±0.06[a]	11.00±0.08[b]
WP/CS -control	6.46±0.18[b]	1.73±0.17[a]	15.30±0.13[a]

หมายเหตุ: WP/CS-C คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP ความเข้มข้นเซลล์ $1.08x10^8$ โคโลนีต่อกรัม (แป้งข้าวโพด)
WP/CS-Ca คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP ความเข้มข้นเซลล์ $1.02x10^8$ โคโลนีต่อกรัม (แป้งมันสำปะหลัง)
WP/CS-RF คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP ความเข้มข้นเซลล์ $1.14x10^8$ โคโลนีต่อกรัม (แป้งข้าวเจ้า)
WP/CS-T คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP ความเข้มข้นเซลล์ $5.20x10^7$ โคโลนีต่อกรัม (ผงทัลคัม)
WP/CS-K คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP ความเข้มข้นเซลล์ $4.50x10^7$ โคโลนีต่อกรัม (ดินขาว)
WP/CS-control คือ อาหารเหลว LB + น้ำมันมะกอก + แป้งข้าวโพด
[ab] อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

คุณสมบัติทางชีวภาพ

ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ทั้ง 5 สูตร โดยการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 หลังการผลิตสูตร (อบแห้ง) โดยใช้ความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นในการผลิตสูตรในช่วง $1.82x10^{10}$-$2.08x10^{10}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผลิตได้มีจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิตหลังการผลิตสูตรที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตร WP/CS-C, WP/CS-Ca และ WP/CS-RF มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตเท่ากับ $1.08x10^8$, $1.02x10^8$ และ $1.04x10^8$ โคโลนีต่อกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 0.52, 0.53 และ 1.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่แบคทีเรียสำเร็จรูปที่ใช้สารตัวพาที่เป็นสารอนินทรีย์ผงทัลคัม (WP/CS-T) และดินขาว (WP/CS-K) มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตที่ลดลงหลังการผลิตสูตร มีจำนวนเซลล์คงเหลือเท่ากับ $5.20x10^7$ โคโลนีต่อกรัม (0.30 เปอร์เซ็นต์) และ $4.50x10^7$ โคโลนีต่อกรัม (0.23 เปอร์เซ็นต์) เนื่องจากสารตัวพาผงทัลคัม (Talcum; T) และดินขาว (Kaolinite; K) เป็นรอนินทรีย์ซึ่งมีส่วนประกอบของผงแร่ชนิดต่างๆ เช่น อิลไลต์ ดิกไคต์ แร่ใยหิน (asbestos) และออกไซด์ ของโลหะต่างๆ ปะปนอยู่เมื่อทำปฏิกิริยากับความร้อน (ความร้อนจากกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อและการอบแห้ง) เกิดการปลดปล่อยสารประกอบที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ได้ (Kumar, Chandra

and Singh, 2011) ประกอบกับผงทัลคัมและดินขาวเมื่อผสมกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียจะเกิดการจับตัวเป็นก้อนและมีลักษณะเหนียวเนื่องจากปริมาณน้ำไม่เหมาะสมทำให้แบคทีเรียกระจายตัวไม่ดี (Suryadi, Susilowati, Riana and Mubarik, 2013) และสารตัวพาผงทัลคัมและดินขาวยังมีข้อจำกัดในการนำมาใช้ในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป คือ มีความฟุ้งกระจาย ยากต่อการนำไปประยุกต์ใช้ รวมถึงผงฝุ่นแร่ที่เป็นองค์ประกอบในทัลคัมและดินขาวส่งผลกระทบต่อระบบทางเดินหายใจของสิ่งมีชีวิต และยังมีราคาสูง (Kumar et al., 2011) ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ใช้สารตัวพาต่างชนิดกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย (โคโลนีต่อกรัม)		
	เซลล์เริ่มต้น (ก่อนการผลิตสูตร)	หลังผลิตสูตร (อบแห้ง)	การรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)
WP/CS-C	$2.08x10^{10}$	$1.08x10^{8}$	0.52
WP/CS-Ca	$1.93x10^{10}$	$1.02x10^{8}$	0.53
WP/CS-RF	$1.89x10^{10}$	$1.04x10^{8}$	1.82
WP/CS-T	$1.82x10^{10}$	$5.20x10^{7}$	0.30
WP/CS-K	$1.92x10^{10}$	$4.50x10^{7}$	0.23

หมายเหตุ : WP/CS-C คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP สารตัวพาแป้งข้าวโพด
WP/CS-Ca คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP สารตัวพาแป้งมันสำปะหลัง
WP/CS-RF คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP สารตัวพาแป้งข้าวเจ้า
WP/CS-T คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP สารตัวพาผงทัลคัม
WP/CS-K คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP สารตัวพาดินขาว

2.2 ประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผลิตจากสารตัวพาต่างชนิดกัน

การทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผง WP ที่ผลิตจากสารตัวพาต่างชนิดกัน มีความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยในช่วง $4.50x10^{7}$-$1.08x10^{8}$ โคโลนีต่อกรัม โดยทำการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ทั้ง 5 สูตร ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงบนเส้นใยเห็ดขอนขาว และตรวจสอบการตายของไรไข่ปลาหลังการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตรต่างๆ นาน 5 วัน พบว่าในวันที่ 1 ของการทดลองแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP ทั้ง 5 สูตร ให้ผลการ

ทำลายไรไข่ปลาที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 โดยส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลา 40.11-56.68 เปอร์เซ็นต์ (เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 = 52.21 เปอร์เซ็นต์) แบคทีเรียสำเร็จรูปสูตร WP/CS-RF ที่มีแป้งข้าวเจ้าเป็นสารตัวพา ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาที่สูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตรอื่น (56.68 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมสารเคมีฆ่าไร (propargite) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าสารเคมีฆ่าไรสามารถทำลายไรไข่ปลาได้ดีที่สุดคือทำให้ไรไข่ปลาตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 กับแบคทีเรียสำเร็จรูปทุกสูตร รวมถึงชุดควบคุม WP/CS-control ที่ไม่พบการตายของไรไข่ปลา

ในวันที่ 2 ของการทดลองพบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 5 สูตร และเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 มีแนวโน้มอัตราการตายของไรไข่ปลาเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 เป็น 0.02-0.25 เท่า โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-RF มีแนวโน้มในการทำลายไรไข่ปลาได้สูงสุด 61.53 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปอื่นๆ และเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย (53.21 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมสารเคมีฆ่าไร พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปทุกสูตรส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาที่ต่ำกว่า โดยสารเคมีฆ่าไรสามารถทำลายไรได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุม WP/CS-control ไม่สามารถฆ่าไรได้

ในวันที่ 3 ของการทดลองพบว่าเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 และแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ใช้สารตัวพาต่างชนิดกันทั้ง 5 สูตร ให้ผลการอัตราการตายของไรไข่ปลาที่เพิ่มขึ้นคล้ายกันกับวันที่ 2 ของการทดลอง ซึ่งเป็นอัตราการทำลายไรไข่ปลาสูงสุดและคงที่จนถึงวันที่ 5 มีอัตราการตายของไรไข่ปลาที่เพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 เป็น 0.23-0.45 เท่า โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-RF ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาสูงสุด 74.80 เปอร์เซ็นต์สูงกว่าเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย (64.25 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ สารเคมีฆ่าไรสามารถฆ่าไรได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุม WP/CS-control ไม่พบการตายของไรไข่ปลา (ตารางที่ 17) จากผลการทดลองเห็นได้ว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-RF ที่ใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นสารตัวพาส่งผลให้เกิดอัตราการทำลายไรไข่ปลาสูงที่สุดในกลุ่มแบคทีเรียสำเร็จรูปด้วยกันที่ใช้สารตัวพาแป้งข้าวโพด (WP/CS-C) และสารตัวพาแป้งมันสำปะหลัง (WP/CS-Ca) ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยสารตัวพากลุ่มสารอินทรีย์มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป มีความปลอดภัย ไม่มีสารพิษ สะดวกต่อการนำมาประยุกต์ใช้ ลดขั้นตอนในการผลิตสูตร มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradable) และมีสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงานให้กับจุลินทรีย์ได้ (Albareda, Rodríguez-Navarro, Camacho and Temprano, 2008; Herrmann and Lesueur, 2013) เห็นได้ว่าสารตัวพาที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 คือสารตัวพาอินทรีย์แป้งข้าวเจ้า (rice

flour) ซึ่งหลังกระบวนการผลิตสูตรยังคงมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตที่สูง ($1.04x10^8$ โคโลนีต่อกรัม) และมีอัตราการตายของไรไข่ปลาที่สูง (74.80 เปอร์เซ็นต์) เช่นกัน ซึ่งในแป้งข้าวเจ้ามีองค์ประกอบที่เป็นแหล่งอาหาร พลังงาน และสารปกป้องเซลล์แบคทีเรียด้วย โดยธรรมชาติแป้งจากพืชมีองค์ประกอบแป้ง resistant starch (RS) ซึ่งเป็นแป้งที่ทนต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของสิ่งมีชีวิตจึงยากต่อการนำมาใช้ประโยชน์ของจุลินทรีย์ โดยมีรายงานว่าแป้งข้าวเจ้ามีปริมาณแป้ง RS เป็นองค์ประกอบในปริมาณต่ำ เท่ากับ 1.60 กรัมต่อ 100 กรัม ขณะที่แป้งข้าวโพด (corn starch) มีปริมาณแป้ง RS เป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงกว่าแป้งข้าวเจ้า 6.90 เท่า (Fuentes-Zaragoza et al., 2011; Lunn and Buttriss, 2007) ส่งผลให้แบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-RF ที่ใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นสารตัวพา นอกจากเซลล์แบคทีเรียจะมีการกระจายตัว และยึดเกาะกับพืช (เส้นใยเห็ด) ได้ดีและสามารถปกป้องเซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้แล้ว (Fravel et al., 1998) ยังสามารถย่อยสลายองค์ประกอบของแป้งข้าวเจ้า เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานในกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ได้ดีกว่าแป้งชนิดอื่นๆ ที่ใช้เป็นสารตัวพา ในการวิจัยนี้ ดังรายงานการวิจัยของ Lee et al. (2006) ทำการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง *B. licheniformis* เพื่อใช้ควบคุมโรคราเทาในมะเขือเทศ ใช้สารตัวพาอินทรีย์แป้งข้าวโพด พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคราสีเทาทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Muis (2016) ที่พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป *B. subtilis* แบบผงสามารถเจริญได้ดีในสารตัวพาอินทรีย์ ได้แก่ แป้งข้าวเจ้า แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพด ซึ่งแบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยพบว่าหลังการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชในเมล็ดข้าวโพดยังคงมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตคงเหลือในเมล็ดข้าวโพดในปริมาณที่สูง ($5.50x10^4$-$1.0x10^6$ โคโลนีต่อเมล็ด) และพบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง *Pseudomonas fluorescens* ที่ใช้สารตัวพาอินทรีย์ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวสาลี ผงกัมและวัสดุเพาะเลี้ยงไส้เดือน เป็นสารตัวพาในการผลิตสูตร แบคทีเรียจะมีการเจริญที่เร็ว และเมื่อเก็บรักษานาน 120 วัน ยังคงมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตและประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่สูง (Chakravarty and Kalita, 2011) เห็นได้ว่าสารตัวพากลุ่มสารอินทรีย์มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป ซึ่งส่งผลดีต่อเซลล์แบคทีเรียเนื่องจากมีองค์ประกอบที่ สามารถเป็นแหล่งพลังงานและธาตุอาหารต่อการเจริญของแบคทีเรียได้ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน โดยเฉพาะแป้งข้าวเจ้าเป็นแหลงคาร์บอนที่ดีสำหรับแบคทีเรียเนื่องจากมีปริมาณแป้งเป็นองค์ประกอบที่สูง (Advinda, 2014) นอกจากนี้สารตัวพากลุ่มสารอินทรีย์มีปริมาณลิกนินสูง ซึ่งมีส่วนช่วยในการยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิด ที่ปนเปื้อนในแบคทีเรียสำเร็จรูปได้ (อวบ สารถ้อย, 2540) ส่วนสารตัวพาที่เป็นกลุ่มอนินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ ผงทัลคัม (WP/CS-T) และ ดินขาว (WP/CS-K) มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตหลังการผลิตสูตรลดลง ส่งผลต่ออัตรา

การตายของไรไข่ปลาที่มีค่าลดลงด้วย อาจเกิดจากความเป็นพิษของสารตัวพากลุ่มอนินทรีย์เนื่องจากผงทัลคัมและดินขาวมีส่วนประกอบของแร่หิน ออกไซด์โลหะต่างๆ ปะปนอยู่เมื่อทำปฏิกิริยากับความร้อนเกิดสารประกอบที่มีความเป็นพิษต่อแบคทีเรีย (Kumar et al., 2011; Suryadi et al., 2013) ส่งผลให้แบคทีเรียสำเร็จรูปที่ใช้สารตัวพากลุ่มอนินทรีย์มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตหลังการผลิตลดลงรวมถึงประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาด้วย ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตร WP/CS-RF ซึ่งเป็นสารตัวพาที่เป็นแป้งข้าวเจ้าที่มีความเหมาะสมในการผลิตสูตรซึ่ง มีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาที่สูงเป็นสารตัวพาอินทรีย์ มีราคาถูกกว่าแป้งชนิดอื่นๆ และหาได้ง่ายไปทำการศึกษาการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปโดยการแปรผันชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมในการผลิตสูตรต่อไป

ตารางที่ 17 อัตราการตายของไรไข่ปลาหลังทดสอบด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผลิตจากสารตัวพาต่างชนิดกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	อัตราการตายของไรไข่ปลา (เปอร์เซ็นต์)				
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
CS	52.21±7.39^{bcA}	53.21±12.23^{bA}	64.25±9.02^{bcA}	64.25±9.02^{bcA}	64.25±9.02^{bcA}
WP/CS-C	45.56±13.86^{bcA}	50.00±16.67^{bA}	65.56±18.95^{bcA}	65.56±18.95^{bcA}	65.56±18.95^{bcA}
WP/CS-Ca	42.22±8.39^{cB}	47.78±13.42^{bA}	61.11±9.62^{bcA}	61.11±9.62^{bcA}	61.11±9.62^{bcA}
WP/CS-RF	56.68±5.25^{bB}	61.53±2.53^{bA}	74.80±6.56^{bA}	74.80±6.56^{bA}	74.80±6.56^{bA}
WP/CS-T	40.11±8.49^{cB}	50.33±4.87^{bA}	55.66±5.87^{cA}	55.66±5.87^{cA}	55.66±5.87^{cA}
WP/CS-K	45.18±6.39^{cB}	53.33±5.77^{bA}	56.67±5.77^{cA}	56.67±5.77^{cA}	56.67±5.77^{cA}
WP/CS-control	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{cA}	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{dA}
Propargite	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}

หมายเหตุ: CS คือ เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ความเข้มข้นเซลล์ 1.98x10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร
WP/CS-C คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP สารตัวพาแป้งข้าวโพด (ความเข้มข้น 1% w/v)
WP/CS-Ca คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP สารตัวพาแป้งมันสำปะหลัง (ความเข้มข้น 1% w/v)
WP/CS-RF คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP สารตัวพาแป้งข้าวเจ้า (ความเข้มข้น 1% w/v)
WP/CS-T คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP สารตัวพาผงทัลคัม (ความเข้มข้น 1% w/v)
WP/CS-K คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP สารตัวพาดินขาว (ความเข้มข้น 1% w/v)
WP/CS-control คือ อาหารเหลว LB + น้ำมันมะกอก + แป้งข้าวโพด (ความเข้มข้น 1% w/v)
สารเคมีกำจัดไร propargite ความเข้มข้น 0.04 % w/v
^{abcd} อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05
^{AB} อักษรที่กำกับในแนวนอนที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3. สารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป

3.1 คุณสมบัติแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผลิตจากสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน

คุณสมบัติทางกายภาพ

ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผง WP ที่ผลิตจากเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียความเข้มข้นที่เหมาะสมในช่วง 10^8 โคโลนีต่อกรัม ใช้แป้งข้าวเจ้า (rice flour; RF) เป็นสารตัวพา โดยทำการแปรผันชนิดของสารลดแรงตึงผิวประกอบด้วยน้ำมันข้าวโพด (corn oil; C) น้ำมันมะกอก (olive oil; O) น้ำมันปาล์ม (palm oil; P) และน้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil; S) ทำการตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าความหนืดของแบคทีเรียสำเร็จรูปหลังกระบวนการผลิตที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลา พบว่าค่า pH ของแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 4 สูตร มีค่าที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่า pH ในช่วง 6.97-7.03 โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตรควบคุม WP/CS-control มีค่า pH ต่ำสุด เช่นเดียวกันกับค่าความหนืดของแบคทีเรียสำเร็จรูปมีค่าในช่วง 1.67-1.93 centipoise ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับทั้งแบคทีเรียสำเร็จรูปและชุดแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตรควบคุม WP/CS-control ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 คุณสมบัติทางกายภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผลิตจากสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	**คุณสมบัติทางกายภาพ**	
	ค่า pH	**ค่าความหนืด (centipoise)**
WP/CS-C	7.00±0.01[a]	1.67±0.29[a]
WP/CS-O	6.97±0.01[a]	1.90±0.36[a]
WP/CS-P	7.01±0.01[a]	1.93±0.11[a]
WP/CS-S	7.03±0.01[a]	1.93±0.31[a]
WP/CS-control	6.46±0.18[b]	1.63±0.15[a]

หมายเหตุ: WP/CS-C คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP ความเข้มข้นเซลล์ $1.18x10^8$ โคโลนีต่อกรัม + แป้งข้าวเจ้า (น้ำมันข้าวโพด)
WP/CS-O คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP ความเข้มข้นเซลล์ $1.12x10^8$ โคโลนีต่อกรัม + แป้งข้าวเจ้า (น้ำมันมะกอก)
WP/CS-P คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP ความเข้มข้นเซลล์ $1.24x10^8$ โคโลนีต่อกรัม + แป้งข้าวเจ้า (น้ำมันปาล์ม)
WP/CS-S คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP ความเข้มข้นเซลล์ $1.30x10^8$ โคโลนีต่อกรัม + แป้งข้าวเจ้า (น้ำมันถั่วเหลือง)
WP/CS-control คือ อาหารเหลว LB + น้ำมันมะกอก + แป้งข้าวเจ้า
[ab] อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

คุณสมบัติทางชีวภาพ

ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ทั้ง 4 สูตร ที่มีสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน โดยการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 หลังการผลิตสูตร (อบแห้ง) โดยใช้ความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นในการผลิตสูตรในช่วง $1.43x10^{10}$ -$2.03x10^{10}$ โคโลนีต่อกรัม พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผลิตได้มีจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่รอดชีวิตไม่แตกต่างกัน (10^8 โคโลนีต่อกรัม) โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตร WP/CS-C, WP/CS-O, WP/CS-P และ WP/CS-S มีความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตเท่ากับ $1.18x10^8$, $1.12x10^8$ $1.24x10^8$ และ $1.30x10^8$ โคโลนีต่อกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 0.55, 0.67, 0.70 และ 0.91 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เห็นได้ว่าน้ำมันพืชทั้ง 5 ชนิดที่เป็นสารลดแรงตึงผิวในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 มีความปลอดภัยต่อเซลล์แบคทีเรีย สามารถนำมาใช้ในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปได้ ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ใช้สารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	**ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย (โคโลนีต่อกรัม)**		
	เซลล์เริ่มต้น (ก่อนการผลิตสูตร)	**หลังผลิตสูตร (อบแห้ง)**	**การรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)**
WP/CS-C	$1.83x10^{10}$	$1.18x10^8$	0.64
WP/CS-O	$2.03x10^{10}$	$1.12x10^8$	0.55
WP/CS-P	$1.76x10^{10}$	$1.24x10^8$	0.70
WP/CS-S	$1.43x10^{10}$	$1.30x10^8$	0.91

หมายเหตุ: WP/CS-C คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP + แป้งข้าวเจ้า + น้ำมันข้าวโพด
WP/CS-O คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP + แป้งข้าวเจ้า + น้ำมันมะกอก
WP/CS-P คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP + แป้งข้าวเจ้า + น้ำมันปาล์ม
WP/CS-S คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP + แป้งข้าวเจ้า + น้ำมันถั่วเหลือง

3.2. ประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผลิตจากสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน

การทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผง WP ที่มีความเข้มข้นเซลล์ในช่วง $1.12x10^8$ -$1.30x10^8$ โคโลนีต่อกรัม

ผสมสารตัวพาแป้งข้าวเจ้า (RF) ที่ผลิตจากสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน โดยทำการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ทั้ง 4 สูตร ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงบนเส้นใยเห็ดขอนขาว และตรวจสอบการตายของไรไข่ปลาหลังการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตรต่างๆ นาน 5 วัน พบว่าในวันที่ 1 ของการทดลองแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP ทั้ง 4 สูตร ให้ผลการทำลายไรไข่ปลาในช่วง 43.33-55.56 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่มีอัตราการตายของไรไข่ปลาเท่ากับ 53.03 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียสำเร็จรูปสูตร WP/CS-S ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นสารลดแรงตึงผิว มีอัตราการตายของไรไข่ปลาเท่ากับ 55.46 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตรอื่น และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมสารเคมีฆ่าไร (propargite) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าสารเคมีฆ่าไรสามารถทำลายไรไข่ปลาได้ดีที่สุดคือทำให้ไรไข่ปลาตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 กับแบคทีเรียสำเร็จรูปทุกสูตร รวมถึงชุดควบคุม WP/CS-control ที่ไม่พบการตายของไรไข่ปลา

ในวันที่ 2 ของการทดลองพบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 4 สูตร และเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 มีแนวโน้มอัตราการตายของไรไข่ปลาเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 เป็น 0.03-0.36 เท่า โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-O ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาได้สูงสุด 68.89 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับแบคทีเรียสำเร็จรูปอื่นๆ และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมสารเคมีฆ่าไร พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปทุกสูตรมีอัตราการตายของไรไข่ปลาที่ต่ำกว่า โดยสารเคมีฆ่าไรสามารถทำลายไรได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุม WP/CS-control ไม่สามารถฆ่าไรได้

ในวันที่ 3 ของการทดลองพบว่าเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 และแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ใช้สารตัวลดแรงตึงผิวต่างชนิดกันทั้ง 4 สูตร ให้ผลการอัตราการตายของไรไข่ปลาที่เพิ่มขึ้นคล้ายกันกับวันที่ 2 ของการทดลอง ซึ่งเป็นอัตราการทำลายไรไข่ปลาสูงสุดและคงที่จนถึงวันที่ 5 โดยมีอัตราการตายของไรไข่ปลาที่เพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 เป็น 0.23-0.80 เท่า โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-O ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาสูงสุด 81.11 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ แบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-P มีอัตราการตายของไรไข่ปลาเท่ากับ 78.89 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตรอื่นๆ ขณะที่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาที่ต่ำกว่า (65.33 เปอร์เซ็นต์) สารเคมีฆ่าไรสามารถฆ่าไรได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุม WP/CS-control ไม่พบการตายของไรไข่ปลา (ตารางที่ 20) จากผลการทดลองเห็นได้ว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-O มีอัตราการตายของไรไข่ปลาสูงที่สุดในกลุ่มแบคทีเรียสำเร็จรูปด้วยกัน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

กับแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตรอื่น ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตร WP/CS-P ซึ่งมีสารตัวลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมคือ น้ำมันปาล์ม (palm oil) ในการผลิตสูตรเนื่องจากน้ำมันปาล์มมีราคาถูก หาได้ง่าย และมีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาที่ไม่แตกต่างกันกับแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ใช้น้ำมันมะกอกเป็นสารลดแรงตึงผิวซึ่งมีราคาที่สูงกว่า น้ำมันพืชที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปจะมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูปในการควบคุมศัตรูพืชได้ โดยน้ำมันทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวระหว่างพื้นผิวของพืช (เส้นใยเห็ด) กับสารละลายทำให้แบคทีเรียผสมกับน้ำและยึดเกาะกับพื้นผิวของพืชได้ดี และน้ำมันพืชยังช่วยในการรักษาปริมาณน้ำอิสระที่จำเป็นต่อการเกิดแรงเต่ง (turgidity) ของเซลล์แบคทีเรียด้วย (Peeran et al., 2014) ดังนั้นส่วนประกอบที่เหมาะสมในการพัฒนาแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 รูปแบบผง WP ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลา มีรายละเอียดของส่วนประกอบในการผลิตสูตร ดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 20 อัตราการตายของไรไข่ปลาหลังทดสอบด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผลิตจากสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	อัตราการตายของไรไข่ปลา (เปอร์เซ็นต์)				
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
CS	53.03±10.89^{bA}	54.63±12.30^{cA}	65.33±8.12^{cA}	65.33±8.12^{cA}	65.33±8.12^{cA}
WP/CS-C	43.33±12.82^{bB}	58.89±8.39^{bcAB}	77.78±8.39^{bA}	77.78±8.39^{bA}	77.78±8.39^{bA}
WP/CS-O	52.22±7.70^{bB}	68.89±7.70^{bA}	81.11±1.92^{bA}	81.11±1.92^{bA}	81.11±1.92^{bA}
WP/CS-P	51.11±3.85^{bB}	67.78±5.09^{bA}	78.89±11.71^{bA}	78.89±11.71^{bA}	78.89±11.71^{bA}
WP/CS-S	55.56±10.72^{bB}	66.67±3.33^{bAB}	71.11±6.94^{bcA}	71.11±6.94^{bcA}	71.11±6.94^{bcA}
WP/CS-control	0.00±0.00^{cA}	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{dA}
Propargite	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}	100.00±0.00^{aA}

หมายเหตุ: CS คือ เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ความเข้มข้นเซลล์ 1.86 x10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร
WP/CS-C คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP + แป้งข้าวเจ้า + น้ำมันข้าวโพด (ความเข้มข้น 1% w/v)
WP/CS-O คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP + แป้งข้าวเจ้า + น้ำมันมะกอก (ความเข้มข้น 1% w/v)
WP/CS-P คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP + แป้งข้าวเจ้า + น้ำมันปาล์ม (ความเข้มข้น 1% w/v)
WP/CS-S คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP + แป้งข้าวเจ้า + น้ำมันถั่วเหลือง (ความเข้มข้น 1% w/v)
WP/CS-control คือ อาหารเหลว LB + แป้งข้าวเจ้า + น้ำมันมะกอก (ความเข้มข้น 1% w/v)
สารเคมีกำจัดไร propargite ความเข้มข้น 0.04 % w/v
^{abcd} อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05
^{AB} อักษรที่กำกับในแนวนอนที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 21 ส่วนประกอบที่เหมาะสมในการพัฒนาแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09

แบคทีเรียสำเร็จรูป	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
WP/CS-XS	เซลล์แขวนลอย (10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	1,000 มิลลิลิตร
	แป้งข้าวเจ้า	100 กรัม
	น้ำมันปาล์ม	5 มิลลิลิตร
	น้ำตาลซูโครส	5 กรัม

4.1.3 ความคงตัวของประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

1. คุณสมบัติแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

1.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

จากการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 โดยมีส่วนผสมในการผลิตประกอบด้วยสารตัวพาแป้งข้าวเจ้า (rice flour; RF) สารลดแรงตึงผิว น้ำมันปาล์ม (palm oil; P) และมีความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียหลังการผลิตสูตรเท่ากับ 2.18×10^{8} โคโลนีต่อกรัม โดยทำการศึกษาความคงตัวของแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผลิตได้ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าความหนืด และปริมาณความชื้นของแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผ่านการเก็บรักษาที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลา พบว่าค่า pH ของแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS (ผสมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย) ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0-180 วัน มีแนวโน้มค่า pH ที่สูงขึ้น (ด่าง) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า pH ในช่วง 7.27-7.73 (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) และ 7.27-7.72 (อุณหภูมิห้อง 28-32 องศาเซลเซียส) โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตรควบคุม WP/CS-control (ไม่มีเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย) มีค่า pH ต่ำสุด (ตารางที่ 22)

ค่าความหนืดของแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 180 วัน มีค่าในช่วง 1.67-1.87 centipoise และ 1.71-1.87 centipoise ตามลำดับ โดยมีแนวโน้มค่าความหนืดที่ลดลง ที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่าความหนืดของแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เก็บรักษานาน 180 วันมีค่าลดลง 0.01 เท่า และที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) มีค่าความหนืด

ลดลง 0.11 เท่า ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และแบคทีเรียสำเร็จรูปสูตรควบคุม WP/CS-control มีค่าความหนืดต่ำสุด (ตารางที่ 23)

ค่าความชื้นของแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน พบว่าการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 0-180 วัน แบคทีเรียสำเร็จรูปมีแนวโน้มค่าความชื้นเพิ่มขึ้นแต่น้อยกว่าที่สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) โดยมีค่าความชื้นในช่วง 9.54-11.28 เปอร์เซ็นต์ (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) และ 9.54-14.72 เปอร์เซ็นต์ (อุณหภูมิห้อง 28-32 องศาเซลเซียส) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเพิ่มขึ้น 0.20-0.54 เท่า หลังการเก็บรักษานาน 180 วัน โดยที่สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) แบคทีเรียสำเร็จรูปมีค่าความชื้นเพิ่มขึ้น 0.54 เท่า สูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS มีค่าความชื้นเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ส่งผลให้อายุการเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูปสั้นลงและประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาลดลงด้วย โดยที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูปมากกว่าที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) (ตารางที่ 24)

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 22 ค่าความเป็นกรด-ด่างของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	ค่า pH						
	วันที่ 0	วันที่ 30	วันที่ 60	วันที่ 90	วันที่ 120	วันที่ 150	วันที่ 180
WP/CS-XS/4°C	7.27 ± 0.01^{bD}	7.56 ± 0.01^{aC}	7.56 ±0.01^{aC}	7.57 ±0.01^{aC}	7.56 ±0.02^{bC}	7.63 ± 0.01^{aB}	7.73 ± 0.02^{aA}
WP/CS-XS/RT	7.27 ± 0.01^{bF}	7.53 ± 0.01^{bD}	7.52 ±0.01^{bD}	7.50 ±0.01^{bE}	7.63 ±0.01^{aB}	7.60 ± 0.02^{bC}	7.72 ± 0.01^{aA}
WP/CS-control/4°C	7.47 ± 0.01^{aA}	7.44 ± 0.02^{cA}	7.46 ±0.02^{cA}	7.48 ±0.01^{cA}	7.50 ±0.01^{cA}	7.50 ± 0.01^{cA}	7.53 ± 0.02^{bA}
WP/CS-control/RT	7.47 ± 0.01^{aA}	7.50 ± 0.01^{cA}	7.52 ±0.01^{bA}	7.46 ±0.02^{cA}	7.50 ±0.01^{cA}	7.50 ± 0.02^{cA}	7.48 ± 0.01^{bA}

ตารางที่ 23 ค่าความความหนืดของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	ค่าความหนืด (centipoise)						
	วันที่ 0	วันที่ 30	วันที่ 60	วันที่ 90	วันที่ 120	วันที่ 150	วันที่ 180
WP/CS-XS/4°C	1.87 ± 0.80^{aA}	1.83 ± 1.51^{aB}	1.80 ± 0.83^{aB}	1.78 ± 1.40^{aB}	1.72 ± 1.15^{aB}	1.70 ± 0.40^{aB}	1.71 ± 0.23^{aB}
WP/CS-XS/RT	1.87 ± 0.80^{aA}	1.80 ± 1.67^{aB}	1.81 ± 0.46^{aB}	1.76 ± 0.40^{aB}	1.70 ± 0.61^{aB}	1.66 ± 0.80^{abB}	1.67 ± 0.35^{aB}
WP/CS-control/4°C	1.73 ± 0.89^{aA}	1.70 ± 0.55^{aA}	1.62 ± 0.80^{bA}	1.63 ± 0.89^{bA}	1.60 ± 0.54^{bA}	1.63 ± 0.83^{bA}	1.58 ± 0.76^{bA}
WP/CS-control/RT	1.73 ± 0.89^{aA}	1.74 ± 0.46^{aA}	1.70 ± 0.67^{bA}	1.68 ± 0.80^{bA}	1.62 ± 0.62^{bB}	1.63 ± 0.67^{bB}	1.60 ± 0.89^{bB}

ตารางที่ 24 ค่าความชื้นของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

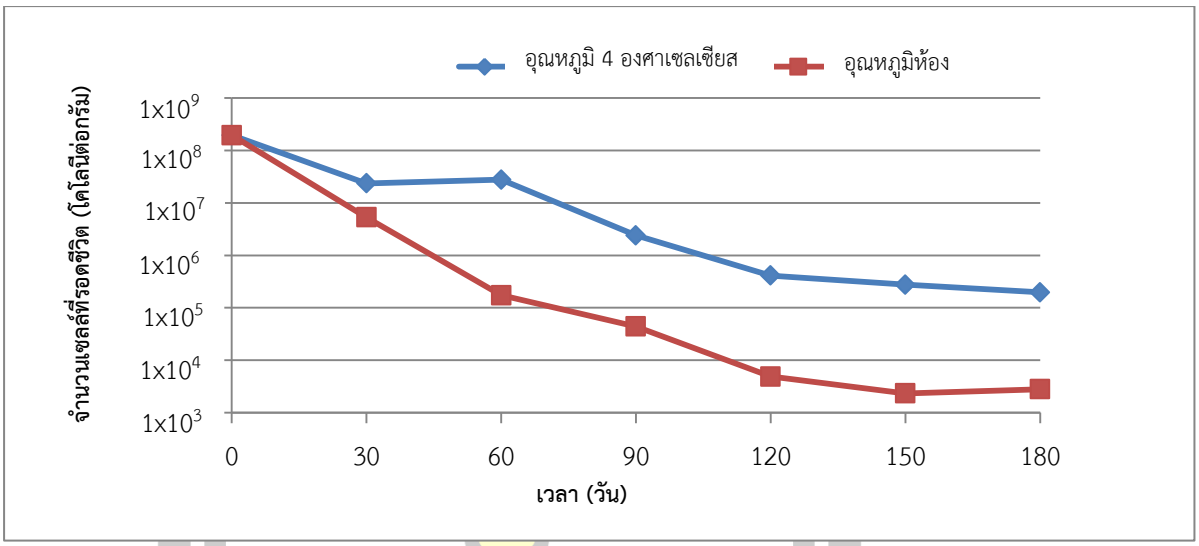
แบคทีเรียสำเร็จรูป	ค่าความชื้น (เปอร์เซ็นต์)						
	วันที่ 0	วันที่ 30	วันที่ 60	วันที่ 90	วันที่ 120	วันที่ 150	วันที่ 180
WP/CS-XS/4°C	9.54 ± 0.97^{aBC}	8.72 ± 0.51^{bC}	8.63 ± 1.00^{bC}	10.09 ± 1.16^{bABC}	10.51 ± 1.19^{aAB}	10.87 ± 0.57^{bAB}	11.28 ± 0.87^{bA}
WP/CS-XS/RT	9.54 ± 0.17^{aB}	13.23 ± 2.30^{aA}	13.11 ± 1.62^{aA}	13.89 ± 0.67^{aA}	13.91 ± 2.35^{aA}	14.04 ± 2.33^{aA}	14.72 ± 0.81^{aA}
WP/CS-control/4°C	9.72 ± 2.48^{aB}	10.10 ± 1.82^{bB}	10.70 ± 2.65^{abAB}	11.00 ± 2.00^{aAB}	11.43 ± 1.50^{aA}	12.10 ± 0.85^{abA}	12.67 ± 0.58^{bA}
WP/CS-control/RT	9.72 ± 2.48^{aB}	10.00 ± 0.81^{bB}	10.22 ± 1.10^{abB}	12.16 ± 2.56^{aA}	12.50 ± 1.08^{aA}	12.60 ± 0.40^{abA}	12.70 ± 0.61^{bA}

หมายเหตุ: WP/CS-XS/4°C คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส; WP/CS-XS/RT คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส)
WP/CS-control/4°C คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP (ไม่มีเซลล์แบคทีเรีย) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส; WP/CS-control/RT คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP (ไม่มีเซลล์แบคทีเรีย) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส)
abc อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05; ABC อักษรที่กำกับในแนวนอนที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

1.2 คุณสมบัติทางชีวภาพ

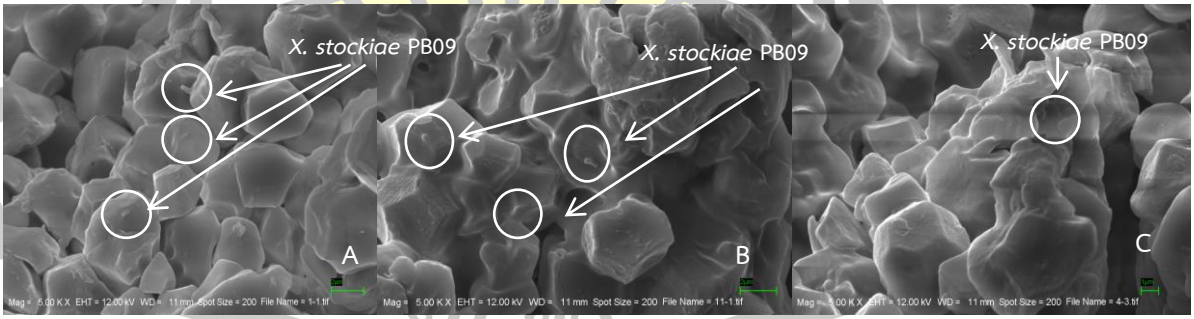
ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0-180 วัน โดยทำการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่มีความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นหลังการผลิตสูตรเท่ากับ $1.96x10^{8}$ โคโลนีต่อกรัม พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS มีแนวโน้มของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลง โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในช่วง $1.97x10^{5}$-$1.96x10^{8}$ และ $2.80x10^{3}$- $1.96x10^{8}$ โคโลนีต่อกรัม เมื่อผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) นาน 180 วัน ตามลำดับ ที่สภาวะการเก็บรักษาอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตคงเหลือ $1.97x10^{5}$ โคโลนีต่อกรัม (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 0.10 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีค่าสูงกว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ที่มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตคงเหลือเพียง $2.8x10^{3}$ โคโลนีต่อกรัม (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 0.001 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูป ซึ่งสภาวะแวดล้อมในการเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูปโดยเฉพาะอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่ออายุการเก็บรักษาและความคงตัวของประสิทธิภาพแบคทีเรียสำเร็จรูป โดยที่สภาวะอุณหภูมิต่ำ (4-5 องศาเซลเซียส) เป็นสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมและส่งผลดีต่อการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียในแบคทีเรียสำเร็จรูป เพราะอุณหภูมิที่ต่ำจะทำให้อัตราเมตาบอลิซึมและกิจกรรมภายในเซลล์จุลินทรีย์เกิดขึ้นอย่างช้าๆ และยังช่วยคงรักษาปริมาณแร่ธาตุ สารอาหาร และคงปริมาณความชื้นภายในเซลล์แบคทีเรียได้ดี (Phiromtan et al., 2013) จึงทำให้แบคทีเรียมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (ภาพประกอบที่ 8)

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว



ภาพประกอบที่ 8 จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตในแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

การศึกษาการคงอยู่ของเซลล์แบคทีเรียบนสารตัวพา (แป้งข้าวเจ้า) ในแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาที่ต่างกัน โดยศึกษาลักษณะการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียบนสารตัวพาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) พบว่าเมื่อระยะเวลาเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูปนานขึ้น แบคทีเรียมีจำนวนลดลงโดยเฉพาะที่สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยพบเซลล์แบคทีเรียที่เกาะติดบนสารตัวพาในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและที่ระยะเวลาเก็บรักษาเริ่มต้น (วันที่ 0) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 9



ภาพประกอบที่ 9 การยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียบนบนสารตัวพาของแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 5,000 เท่า เมื่อ A: การเก็บรักษาที่ระยะเวลาเริ่มต้น (วันที่ 0); B: การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (นาน 180 วัน) ; C: การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส นาน 180 วัน)

2. ประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ที่เก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ผลการทดสอบความคงตัวของแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ในการทำลายไรไข่ปลา พบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาเริ่มต้น แบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ให้อัตราการตายของไรไข่ปลาที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 (71.50 เปอร์เซ็นต์) โดยมีอัตราการตายของไรไข่ปลาเท่ากับ 76.66 เปอร์เซ็นต์

การเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS นาน 30 วัน พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ได้แก่ WP/CS-XS/4°C และ WP/CS-XS/RT ให้อัตราการตายของไรไข่ปลาลดลงจากระยะเวลาเก็บรักษาเริ่มต้น (วันที่ 0) เป็น 0.03-0.25 เท่า โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/4°C มีอัตราการตายของไรไข่ปลาสูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/RT มีอัตราการตายของไรไข่ปลาเท่ากับ 72.22 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 (CS) ที่ทำการเพาะเลี้ยงใหม่โดยไม่ผ่านการเก็บรักษามีอัตราการตายของไรไข่ปลาเท่ากับ 69.10 เปอร์เซ็นต์

การเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS นาน 60 วัน พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) มีอัตราการตายของไรไข่ปลาลดลงจากระยะเวลาเก็บรักษาเริ่มต้น (วันที่ 0) 0.10-0.31 เท่า โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/4°C มีอัตราการตายของไรไข่ปลาเท่ากับ 70.89 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/RT ที่มีอัตราการตายของไรไข่ปลาเท่ากับ 53.11 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/4°C มีอัตราการตายของไรไข่ปลาที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 (68.20 เปอร์เซ็นต์)

การเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS นาน 90 วัน พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) มีแนวโน้มอัตราการตายของไรไข่ปลาลดลงเช่นเดียวกับที่การเก็บรักษานาน 60 วัน โดยมีอัตราการตายไรไข่ปลาลดลงจากระยะเวลาเก็บรักษาเริ่มต้น (วันที่ 0) 0.04-0.45 เท่า ซึ่งแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/4°C มีอัตราการตายของไรไข่ปลาเท่ากับ 73.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/RT และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 (66.76 เปอร์เซ็นต์)

การเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS นาน 120 วัน พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (WP/CS-XS/4°C) และอุณหภูมิห้อง 28-32 องศาเซลเซียส (WP/CS-XS/RT) มีอัตราการตายของไรไข่ปลาลดลงจากระยะเวลาเก็บรักษาเริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ 0.16-0.54 เท่า โดยประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผ่านการเก็บรักษานาน 120 วัน มีค่าลดลงมากกว่าที่ระยะเวลาเก็บรักษานาน 90 วัน โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/4°C ยังคงมีแนวโน้มในการทำลายไรไข่ปลาดีกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/RT มีอัตราการตายของไรไข่ปลาที่ระยะเวลาเก็บรักษานาน 120 วัน เท่ากับ 64.44 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 (70.15 เปอร์เซ็นต์) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS นาน 150 วัน พบว่าอัตราการตายของไรไข่ปลามีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกันกับการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 120 วัน โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/4°C และ WP/CS-XS/RT ที่เก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) มีอัตราการตายของไรไข่ปลาลดลงจากระยะเวลาเก็บรักษาเริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ 0.20-0.60 เท่า โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/4°C ยังคงมีแนวโน้มในการทำลายไรไข่ปลาที่สูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/RT โดยมีอัตราการตายของไรไข่ปลาเท่ากับ 62.22 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่แบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/RT มีอัตราการตายของไรไข่ปลาลดลงเหลือเพียง 31.85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผ่านการเก็บรักษาทั้ง 2 สภาวะอุณหภูมิมีอัตราการตายของไรไข่ปลาต่ำกว่าเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (70.22 เปอร์เซ็นต์)

การเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS นาน 180 วัน พบว่าอัตราการตายของไรไข่ปลามีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจากระยะเวลาเก็บรักษาเริ่มต้น (วันที่ 0) โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/4°C และ WP/CS-XS/RT ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) มีอัตราการตายของไรไข่ปลาลดลงจากระยะเวลาเก็บรักษาเริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ 0.23-0.64 เท่า ซึ่งแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/4°C มีอัตราการตายของไรไข่ปลาเท่ากับ 58.67 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS/RT ที่มีอัตราการตายของไรไข่ปลาลดลงคงเหลือเพียง 27.89 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยแบคทีเรียสำเร็จรูปที่ผ่านการเก็บรักษาทั้ง 2 สภาวะอุณหภูมิ มีอัตราการตายของไรไข่ปลาที่ต่ำกว่าเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 (68.86 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาพรวมของการทดสอบความคงตัวในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ที่เก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศา

เซลเซียส) ที่ระยะเวลาต่างกัน พบว่าประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น (0-180 วัน) โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ที่เก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีความคงตัวของประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาที่ดีกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) โดยมีอัตราการตายของไรไข่ปลาที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเริ่มต้น (วันที่ 0) ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับที่ระยะเวลาการเก็บรักษานาน 30, 60, 90 และ 120 วัน ขณะที่แบคทีเรียสำเร็จรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) มีความคงตัวของประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาที่ต่ำหรือมีอายุการเก็บรักษาที่สั้น คือ 60 วัน ซึ่งยังมีอัตราการตายของไรไข่ปลา ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับที่ระยะเวลาเก็บรักษาเริ่มต้น (วันที่ 0) ดังแสดงผลในตารางที่ 25 จากผลการศึกษาเห็นได้ว่าสภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS โดยการเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูปที่สภาวะอุณหภูมิที่ต่ำช่วยให้แบคทีเรียมีอัตราการรอดชีวิตที่สูง เนื่องจากอุณหภูมิต่ำส่งผลให้แบคทีเรียมีอัตราเมตาบอลิซึมและกิจกรรมทางสรีรวิทยาภายในเซลล์ลดลง (Phiromtan et al., 2013) นอกจากนี้ยังช่วยรักษาปริมาณแร่ธาตุ สารอาหาร และปริมาณน้ำในส่วนประกอบในการผลิตสูตรให้กับแบคทีเรียได้ด้วย ซึ่งส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลไดแซคคาไรด์ช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรียให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น ความร้อน แรงดันออสโมติก และอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยังช่วยคงสภาพการทำงานของเอนไซม์ และสภาพเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย ทำให้เซลล์แบคทีเรียมีอัตราการรอดชีวิตและประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาที่สูง (Fillinger et al., 2001; Lee et al., 2006; Manikandan et al., 2010) ขณะที่การเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ซึ่งอุณหภูมิไม่คงที่เพราะมีการแปรผันตามสภาพแวดล้อมภายนอก ส่งผลให้แบคทีเรียสำเร็จรูปมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตต่ำ รวมถึงประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลามีแนวโน้มลดลงจากระยะเวลาเก็บรักษาเริ่มต้น เพราะสภาวะอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและไม่คงที่ ซึ่งสามารถส่งผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียการผลิตและทำงานของเอนไซม์ไม่เหมาะสม และอุณหภูมิที่สูงขึ้นอาจส่งผลให้ปริมาณแป้ง resistant starch (RS) ไม่คงที่เนื่องจากสภาพแวดล้อมการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม (อุณหภูมิ ความชื้น และค่า pH) โดยเฉพาะความร้อนที่เพิ่มขึ้นจากอุณหภูมิที่ไม่คงที่ในการเก็บรักษาอาจส่งผลให้ปริมาณแป้ง RS เพิ่มสูงขึ้นได้ โดยความร้อนมีผลต่อพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ภายในโครงสร้างของโมเลกุลแป้ง (Chou, Wu, Nurtama and Lin, 2010; Fuentes-Zaragoza et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีผลต่อปริมาณและชนิดสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบในสารตัวพาแป้งข้าวเจ้า เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน รวมถึงส่วนประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรียมีปริมาณลดลงได้ เนื่องจาก

ความร้อนจากอุณหภูมิที่ไม่คงที่ในการเก็บรักษาอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในโมเลกุลของแป้งและสารอาหารต่างๆ ที่เป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ (Advinda, 2014; Fuentes-Zaragoza et al., 2011) ส่งผลให้แหล่งอาหารของแบคทีเรียลดลงทำให้แบคทีเรียมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำรวมถึงประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาที่ลดลงด้วย

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 25 อัตราการตายของไรไข่ปลาหลังทดสอบด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

แบคทีเรียสำเร็จรูป	ระยะเวลาเก็บรักษา (วัน)						
	วันที่ 0	วันที่ 30	วันที่ 60	วันที่ 90	วันที่ 120	วันที่ 150	วันที่ 180
CS	71.50 ± 9.66^{bA}	69.10 ± 6.04^{bA}	68.20 ± 5.01^{bA}	66.76 ± 10.64^{bA}	70.15 ± 9.84^{bA}	70.22 ± 8.38^{bA}	68.86 ± 10.56^{bA}
WP/CS-XS/4°C	76.66 ± 11.34^{bA}	72.22 ± 7.09^{bABC}	70.89 ± 8.39^{bABC}	73.33 ± 10.33^{bAB}	64.44 ± 10.71^{cBCD}	62.22 ± 6.94^{cCD}	58.67 ± 9.31^{cD}
WP/CS-XS/RT	76.66 ± 11.34^{bA}	57.18 ± 9.68^{cAB}	53.11 ± 3.01^{cB}	41.89 ± 8.36^{cC}	35.18± 4.62^{dCD}	31.85 ± 8.21^{dD}	27.89 ± 10.90^{dD}
WP/CS-control/4°C	0.00 ± 0.00^{cA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}
WP/CS-control/ RT	0.00 ± 0.00^{cA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}
Propargite	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}	100.00 ± 0.01^{aA}	100.00 ± 0.00^{aA}

หมายเหตุ: CS คือ เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ความเข้มข้นเซลล์ 1.90-2.06x10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร (เพาะเลี้ยงแบคทีเรียใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดสอบและไม่ผ่านการเก็บรักษา)

WP/CS-XS/4°C คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 1% w/v

WP/CS-XS/RT คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้น 1% w/v

WP/CS-control/4°C คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP (ไม่มีเซลล์แบคทีเรีย) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 1% w/v

WP/CS-control/RT คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปผง WP (ไม่มีเซลล์แบคทีเรีย) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้น 1% w/v

สารเคมีกำจัดไร propargite ความเข้มข้น 0.04 % w/v

^{abcde} อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

^{ABCD} อักษรที่กำกับในแนวนอนที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

4.2 ประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในระดับโรงเรือน

4.2.1 ผลประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูปในระดับโรงเรือน

1. สภาวะโรงเรือนทดสอบ

ผลของการศึกษาประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผงละลายน้ำ WP/CS-XS ที่ได้จากการพัฒนาสูตรในระดับห้องปฏิบัติการนำมาศึกษาในระดับโรงเรือน โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาในเห็ดขอนขาว จำนวน 6 โรงเรือน ทั้งในสภาวะป้องกันการแพร่ระบาดและหลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา จากนั้นนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริล โดยทำการทดสอบในช่วงเดือนเมษายนถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2561 และทำการบันทึกข้อมูลสภาวะโรงเรือนทดสอบได้แก่ อุณหภูมิเฉลี่ย และค่าความชื้นในแต่ละโรงเรือนทดสอบเปรียบเทียบกัน ดังแสดงผลในตารางที่ 26 พบว่าอุณหภูมิเฉลี่ยในโรงเรือนเห็ดขอนขาวทั้ง 6 โรงเรือน มีค่าในช่วง 33.95-35.25 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกันกับค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของโรงเรือนทดสอบมีค่าอยู่ในช่วง 80.30-81.76 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 26) โดยช่วงค่าอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์ความชื้นดังกล่าวเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเห็ดขอนขาวโดยเฉพาะช่วงของการเปิดดอกเห็ด (อภิชาต ศรีสะอาด และ จันทรา อู่สุวรรณ, 2556) โดยการเพาะเห็ดขอนขาวในระดับโรงเรือนจะต้องมีการควบคุมสภาวะอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส และความชื้นในช่วง 80-85 เปอร์เซ็นต์ เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเปิดดอกเห็ดซึ่งเป็นผลผลิตจากการเพาะเห็ด เนื่องจากเห็ดขอนขาวเป็นเห็ดที่เจริญได้ดีในสภาวะร้อนชื้น เกษตรกรนิยมเพาะปลูกในช่วงฤดูร้อนถึงต้นฤดูฝนของทุกปี (อภิชาต ศรีสะอาด และ จันทรา อู่สุวรรณ, 2556)

2. ผลผลิตและค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพ

การศึกษาประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาศัตรูเห็ดขอนขาวของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผงละลายน้ำ WP/CS-XS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในระดับโรงเรือน ซึ่งทำการทดสอบจำนวน 6 โรงเรือน ในสภาวะป้องกันการแพร่ระบาดของไรไข่ปลาและหลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริล ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 โรงเรือนควบคุม ได้แก่ โรงเรือนที่ 1 เห็ดขอนขาวที่ไม่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา และโรงเรือนที่ 2 เห็ดขอนขาวที่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา

กลุ่มที่ 2 โรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริล ได้แก่ โรงเรือนที่ 3 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นสารคาร์บาริลก่อนการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา

และโรงเรือนที่ 4 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นสารคาร์บาริลหลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา

กลุ่มที่ 3 โรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป ได้แก่ โรงเรือนที่ 5 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปก่อนการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา และโรงเรือนที่ 6 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปหลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา

ทำการเก็บผลผลิตเห็ดขอนขาวแต่ละโรงเรือนทดสอบทุกวัน แล้วนำมาชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณผลผลิตเห็ดขอนขาวเฉลี่ยต่อก้อน และคำนวณค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพของเห็ด (biological efficiency; %B.E.) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถในการเจริญเติบโตของเห็ดขอนขาวที่ผ่านการการทดสอบทั้ง 6 โรงเรือน ผลการวิจัยพบว่า ผลผลิตเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบทั้ง 6 โรงเรือน มีค่าผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 69.78-124.33 กรัมต่อก้อน โดยโรงเรือนที่ 3 ที่ฉีดพ่นสารคาร์บาริลก่อนการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา (สภาวะป้องกันการแพร่ระบาดด้วยสารเคมี) มีผลผลิตเห็ดเฉลี่ยสูงสุด 124.33 กรัมต่อก้อน รองลงมาคือโรงเรือนที่ 1 ชุดควบคุม (เห็ดขอนขาวที่ไม่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา) และโรงเรือนที่ 5 ที่ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปก่อนการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา (สภาวะป้องกันการแพร่ระบาดด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป) มีค่าผลผลิตเห็ดเฉลี่ย 120.94 และ 118.88 กรัมต่อก้อน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่โรงเรือนที่ 2 ชุดควบคุม (เห็ดขอนขาวที่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา) ที่ไม่มีการฉีดพ่นสารคาร์บาริลและแบคทีเรียสำเร็จรูปพบว่ามีผลผลิตเห็ดเฉลี่ยต่ำสุด คือ 69.78 กรัมต่อก้อน แตกต่างจากผลผลิตเห็ดเฉลี่ยจากโรงเรือนทดสอบอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าผลผลิตเห็ดเฉลี่ยของโรงรือนทดสอบกลุ่มที่ 2 (โรงเรือนที่ 3 และ 4) ที่ฉีดพ่นด้วยสารคาร์บาริล และโรงเรือนทดสอบกลุ่มที่ 3 (โรงเรือนที่ 5 และ 6) ที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้งในสภาวะป้องกันการแพร่ระบาดของไรไข่ปลาและหลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา พบว่ามีผลผลิตเห็ดเฉลี่ยเท่ากับ 114.94-124.33 และ 110.37-118.88 กรัมต่อก้อน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกันกับโรงเรือนที่ 1 ชุดควบคุมที่มีเฉพาะเห็ดขอนขาวที่ไม่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา (120.94 กรัมต่อก้อน) สรุปได้ว่าการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS และสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริลเพื่อควบคุมการแพร่ระบาดของไรไข่ปลาในระดับโรงเรือนให้ผลผลิตเห็ดเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และการฉีดพ่นในสภาวะป้องกันการแพร่ระบาดของไรไข่ปลาและการควบคุมหลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา พบว่ามีผลผลิตเห็ดเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้ง 2 กรรมวิธี เช่นเดียวกันกับผลผลิตเห็ดเฉลี่ยจากโรงเรือนทดสอบชุดควบคุมซึ่งมีเฉพาะเห็ดขอนขาวที่ไม่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา (โรงเรือนที่ 1) ดังแสดงในตารางที่ 26 สอดคล้องกันกับค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพของเห็ด (biological efficiency; %B.E.) พบว่าค่า %B.E. ของเห็ดขอนขาวในโรงเรือนทดสอบที่ 1, 3, 4, 5 และ 6 มีค่าเท่ากับ 37.80, 38.85, 35.92, 37.15 และ 34.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่โรงเรือน

ทดสอบที่ 2 มีค่า %B.E. ต่ำสุด (21.81 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผงละลายน้ำ WP/CS-XS มีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาที่แพร่ระบาดในเห็ดขอนขาวในสภาวะโรงเรือนที่ไม่แตกต่างกันกับโรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริลที่เกษตรกรนิยมใช้ (เซฟวิน 85) โดยมีค่าผลผลิตเห็ดเฉลี่ยและค่า %B.E. ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และจากผลการทดสอบพบว่าโรงเรือนทดสอบที่ 5 และ 6 ที่มีการใช้แบคทีเรียสำเร็จรูปในการควบคุมไรไข่ปลาเห็ดขอนขาวมีการเจริญที่เร็วเมื่อเปรียบเทียบกับโรงเรือนทดสอบอื่น ซึ่งแบคทีเรียสำเร็จรูปอาจมีส่วนช่วยกระตุ้นการออกดอกของเห็ดได้เร็วขึ้น และส่วนผสมในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส แป้งข้าวเจ้า และน้ำมันปาล์มที่ผสมกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ในอาหารเหลว LB ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียและเห็ดได้ ซึ่งอาจจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียและเห็ดได้ ทั้งยังส่งเสริมเซลล์แบคทีเรียให้สามารถสร้างสารเมตาบอไลท์และปลดปล่อยออกนอกเซลล์ในระหว่างที่ยึดเกาะบนเส้นใยเห็ด (Fadahunsi and Ayansina, 2013) รวมถึงน้ำมันปาล์มที่ผสมใช้สูตรซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวทำให้แบคทีเรียยึดเกาะกับเส้นใยเห็ดได้ดีขึ้น และเป็นสารที่ช่วยรักษาสารอาหารในส่วนประกอบผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปรวมถึงคงปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย (Lee et al., 2006) นอกจากนี้ สารลดแรงตึงผิวยังมีส่วนช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ (Burges and Jones, 1998; Fillinger et al., 2001; Fravel et al., 1998) ดังรายงานวิจัยของ หริพันธุ์ สมนิล และคณะ (2560) ที่ทดสอบการใช้แบคทีเรียสำเร็จรูป *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคราดำในก้อนเห็ดนางฟ้าภูฐาน พบว่าสามารถควบคุมโรคราดำได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยให้ผลผลิตเห็ดสูงสุด 732.51 กรัมต่อก้อน ขณะที่ก้อนเห็ดที่ใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมให้ผลผลิตเห็ดที่ต่ำกว่า (612.95 กรัมต่อก้อน)

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 26 ประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในระดับโรงเรือน

โรงเรือนทดสอบ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	ผลผลิตเห็ด (กรัมต่อก้อน)	ค่า B.E. (%)
1	33.95±0.92[a]	81.50±2.19[a]	120.94±7.04[a]	37.80±2.20[a]
2	35.25±0.18[a]	80.30±6.65[a]	69.78±6.43[b]	21.81±2.01[b]
3	34.65±0.25[a]	80.57±4.86[a]	124.33±1.03[a]	38.85±0.32[a]
4	34.25±0.88[a]	81.32±12.70[a]	114.94±4.20[a]	35.92±1.31[a]
5	34.75±0.53[a]	81.76±14.91[a]	118.88±4.24[a]	37.15±1.33[a]
6	35.20±0.92[a]	80.93±12.18[a]	110.37±7.48[a]	34.50±2.34[a]

หมายเหตุ: โรงเรือนที่ 1 โรงเรือนควบคุม (เห็ดขอนขาว)
โรงเรือนที่ 2 โรงเรือนควบคุม (เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา)
โรงเรือนที่ 3 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ด (0.1% w/v) ก่อนการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา
โรงเรือนที่ 4 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ด (0.1% w/v) หลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา
โรงเรือนที่ 5 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป (1% w/v) ก่อนการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา
โรงเรือนที่ 6 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป (1% w/v) หลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา
[ab] อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

4.2.2 ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ (proximate analysis) และปริมาณสารเคมีตกค้างในเห็ดขอนขาว

1. คุณค่าทางโภชนาการของเห็ดขอนขาว (proximate analysis)

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบทั้ง 6 โรงเรือน เพื่อเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการเบื้องต้นของเห็ดขอนขาวที่ผ่านการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผงละลายน้ำ WP/CS-XS และสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริลในการทำลายไรไข่ปลา เป็นระยะเวลา 4 เดือน (เมษายน-กรกฎาคม พ.ศ. 2561) พบว่าตัวอย่างเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบทั้ง 6 โรงเรือน มีปริมาณเถ้า (ash) ซึ่งแสดงถึงส่วนของสารอนินทรีย์ที่เป็นแร่ธาตุต่างๆ ที่ไม่ให้พลังงานมีปริมาณในช่วง 7.64-8.74 เปอร์เซ็นต์ โดยตัวอย่างเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบที่ 3, 4, 5 และ 6 ที่ฉีดพ่นด้วยสารคาร์บาริลและแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้งในสภาวะป้องกันการแพร่ระบาดของไรไข่ปลาและหลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา มีปริมาณเถ้าเท่ากับ 8.48, 8.55, 8.65 และ 8.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สูงกว่าปริมาณเถ้าในตัวอย่างเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบที่ 1 และ 2 ที่เป็นชุดควบคุมซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าความชื้นในตัวอย่างเห็ดขอนขาวจากทั้ง 6 โรงเรือนทดสอบ

มีค่าที่ต่ำอยู่ในช่วง 6.33-7.50 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเห็ดขอนขาวมีน้ำเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่ต่ำ โดยเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบที่ 1 ชุดควบคุม (เห็ดขอนขาวที่ไม่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา) มีความชื้นสูงสุด 7.50 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเกิดจากโรงเรือนที่ 1 เป็นชุดควบคุมที่มีเฉพาะเห็ดขอนขาวที่ไม่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา (เห็ดมีการเจริญปกติ) ส่งผลให้ปริมาณน้ำที่เป็นองค์ประกอบของเห็ดไม่ถูกทำลายจึงมีค่าความชื้นที่สูง ขณะที่ตัวอย่างเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบอื่นมีการแพร่ระบาดและเข้าทำลายเห็ดของไรไข่ปลาซึ่งอาจส่งผลทำให้ปริมาณน้ำในเห็ดลดลงจึงทำให้มีตัวอย่างเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบดังกล่าวมีค่าความชื้นที่ต่ำกว่าโรงเรือนควบคุมที่ไม่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา (โรงเรือนที่ 1) (อภิชาต ศรีสะอาด และ จันทรา อู่สุวรรณ, 2556) ส่วนของปริมาณโปรตีนรวม (crude protein) ของตัวอย่างเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบทั้ง 6 โรงเรือน มีค่าในช่วง 26.90-29.70 เปอร์เซ็นต์ เห็ดขอนขาวจากโรงเรือนที่ 6 ที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูปหลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลามีปริมาณโปรตีนรวมสูงสุด 29.70 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนที่ 5 ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูปก่อนการแพร่ระบาดของไรไข่ปลาและโรงเรือนที่ 1 ชุดควบคุม (เห็ดขอนขาวที่ไม่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา) มีปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 28.86 และ 28.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนรวมของเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริล (โรงเรือนที่ 3 และ 4) และโรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป (โรงเรือนที่ 5 และ 6) มีปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 27.21-28.12 และ 28.86-29.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนที่ 2 ชุดควบคุม (เห็ดขอนขาวที่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา) มีปริมาณโปรตีนรวมต่ำสุด (26.90 เปอร์เซ็นต์) สอดคล้องกับปริมาณเยื่อใยหยาบ (crude fiber) ที่พบว่าเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป (โรงเรือนที่ 5 และ 6) มีปริมาณเยื่อใยหยาบที่สูง เท่ากับ 11.03-11.23 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนที่ 1 ชุดควบคุม (เห็ดขอนขาวที่ไม่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา) มีปริมาณเยื่อใยหยาบเท่ากับ 10.94 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และปริมาณเยื่อใยหยาบของเห็ดขอนขาวจากกลุ่มโรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป (โรงเรือนที่ 5 และ 6) มีปริมาณที่สูงกว่าเห็ดขอนขาวจากกลุ่มโรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริล (โรงเรือนที่ 3 และ 4) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบที่ 2 ชุดควบคุม (เห็ดขอนขาวที่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา) มีปริมาณเยื่อใยหยาบต่ำสุด คือ 7.46 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (nitrogen-free extract) พบว่าเห็ดขอนขาวจากกลุ่มโรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป (โรงเรือนที่ 5 และ 6) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุด 46.47-49.11

เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเห็ดขอนขาวจากกลุ่มโรงเรือนควบคุม (โรงเรือนที่ 1 และ 2) และกลุ่มโรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริล (โรงเรือนที่ 3 และ 4) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 43.44-43.67 และ 42.30-44.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนปริมาณไขมันในตัวอย่างเห็ดขอนขาวจากทุกโรงเรือนทดสอบมีค่าที่ต่ำกว่า 2.50 เปอร์เซ็นต์ โดยเห็ดขอนขาวโรงเรือนทดสอบที่ 1 มีปริมาณไขมันสูงสุด 2.27 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงผลในตารางที่ 27 จากผลการวิจัยเห็นได้ว่าเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนที่มีการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS มีคุณค่าทางโภชนาการที่สูง แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับตัวอย่างเห็ดขอนขาวที่มีการฉีดพ่นด้วยสารคาร์บาริลในการควบคุมไรไข่ปลา รวมถึงตัวอย่างเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนควบคุมที่ไม่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลาด้วย การฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปและสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดทั้งในสภาวะ ก่อนและหลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลาพบว่าไม่มีผลต่อปริมาณคุณค่าทางโภชนาการของเห็ดขอนขาว จากผลการวิจัยนี้พบว่าค่าโปรตีนรวม (26.90-29.70 เปอร์เซ็นต์) และปริมาณเยื่อใยหยาบ (9.83-11.23 เปอร์เซ็นต์) ของเห็ดขอนขาวมีค่าที่ สูงกว่าผลการวิจัยของ Giri, Mandal, and Acharya (2013); I. O. Okoro (2012); Nwanze, Khan, Ameh and Umoh (2006) ที่ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของเห็ดขอนขาว พบว่ามีปริมาณโปรตีนรวมและเยื่อใยหยาบ ในช่วง 22.82-27.0 เปอร์เซ็นต์ และ 7.64-8.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 65.00-68.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่พบในตัวอย่างเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบที่ 5 และ 6 (ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป) ซึ่งตัวอย่างเห็ดจากโรงเรือนที่ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ต่ำกว่า (44.47-49.11 เปอร์เซ็นต์) เห็นได้ว่าผลผลิตเห็ดขอนขาวที่ใช้แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผงละลายน้ำ WP/CS-XS ในการทำลายไรไข่ปลามีคุณค่าทางโภชนาการที่ไม่แตกต่างกันกับเห็ดขอนขาวที่ไม่มีการแพร่ระบาดของไรไข่ปลาและไม่ฉีดพ่นสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ด ซึ่งมีความปลอดภัยและใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อสุขภาพที่มีปริมาณเยื่อใยหยาบและโปรตีนรวมที่สูงกว่าเห็ดขอนขาวที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริล

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 27 ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของเห็ดขอนขาว

โรงเรือนทดสอบ	คุณค่าทางโภชนาการเห็ดขอนขาว (proximate analysis)					
	เถ้า (เปอร์เซ็นต์)	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีนรวม (เปอร์เซ็นต์)	เยื่อใยหยาบ (เปอร์เซ็นต์)	คาร์โบไฮเดรต (เปอร์เซ็นต์)	ไขมัน (เปอร์เซ็นต์)
1	7.64±0.14^{b}	7.50±0.02^{a}	28.54±0.11^{b}	10.94±0.05^{a}	43.44±0.80^{b}	2.27±0.04^{a}
2	7.87±0.05^{b}	6.50±0.13^{d}	26.90±0.38^{d}	7.46±0.17^{c}	43.67±1.87^{b}	1.98±0.06^{b}
3	8.48±0.22^{a}	6.67±0.03^{c}	28.12±0.76^{bc}	10.56±0.14^{ab}	42.30±0.07^{b}	1.95±0.05^{b}
4	8.55±0.03^{a}	6.33±0.05^{d}	27.21±0.63^{cd}	9.83±0.11^{b}	44.65±0.64^{b}	2.03±0.02^{b}
5	8.65±0.05^{a}	6.88±0.01^{b}	28.86±0.20^{ab}	11.03±0.04^{a}	46.47±1.45^{ab}	1.98±0.05^{b}
6	8.74±0.01^{a}	6.63±0.05^{c}	29.70±0.23^{a}	11.23±0.17^{a}	49.11±0.76^{a}	2.03±0.06^{b}

หมายเหตุ: โรงเรือนที่ 1 โรงเรือนควบคุม (เห็ดขอนขาว)
โรงเรือนที่ 2 โรงเรือนควบคุม (เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา)
โรงเรือนที่ 3 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ด (0.1% w/v) ก่อนการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา
โรงเรือนที่ 4 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ด (0.1% w/v) หลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา
โรงเรือนที่ 5 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป (1% w/v) ก่อนการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา
โรงเรือนที่ 6 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป (1% w/v) หลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา
^{abcd} อักษรที่กำกับในแนวตั้งที่ต่างกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

2. ปริมาณสารเคมีตกค้างในเห็ดขอนขาว

วิเคราะห์ปริมาณสารเคมีตกค้างในตัวอย่างเห็ดขอนขาวที่ได้จากแต่ละโรงเรือนทดสอบทั้ง 6 โรงเรือน โดยทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมต (carbamate) ได้แก่ สารคาร์บาริล (carbaryl) มีชื่อทางการค้า เซฟวิน 85 ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดที่เกษตรกรนิยมใช้ ด้วยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Liquid Chromatography Mass Spectrometer (LC-MS) พบว่ามีเพียงตัวอย่างเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบที่ 3 และ 4 เท่านั้น ที่พบปริมาณสารคาร์บาริลตกค้างแต่มีค่าในปริมาณที่ต่ำ คือ 0.0004 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 28) โดยโรงเรือนทดสอบทั้ง 2 โรงเรือนนี้เป็นการทดสอบสภาวะการใช้สารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดในการป้องกันและกำจัดไรไข่ปลาก่อนและหลังการแพร่ระบาด ซึ่งมีการฉีดพ่นสารเคมีคาร์บาริล ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาณ 300 มิลลิลิตรต่อโรงเรือน โดยทำการฉีดพ่น 2 ครั้งต่อสัปดาห์ อ้างอิงตามวิธีการใช้ในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงตรวจพบปริมาณสารเคมีตกค้างในผลผลิตเห็ดดังกล่าว ขณะที่เห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบอื่น (โรงเรือนที่ 1, 2, 5 และ 6) ไม่พบปริมาณสารคาร์บาริลตกค้าง เห็นได้ว่าเห็ดขอนขาวที่ใช้แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผงละลายน้ำ WP/CS-XS ไม่พบการตกค้างของสารเคมีกำจัด

ไรศัตรูเห็ด จึงปลอดภัยต่อการนำมาบริโภคเช่นเดียวกันกับเห็ดขอนขาวโรงเรือนทดสอบที่ 1 และ 2 ที่ไม่มีการใช้สารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริล

ตารางที่ 28 ปริมาณสารคาร์บาริล (carbaryl) ตกค้างในเห็ดขอนขาว

โรงเรือนทดสอบ	ปริมาณสารคาร์บาริล (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
1	ไม่พบ
2	ไม่พบ
3	0.0004
4	0.0004
5	ไม่พบ
6	ไม่พบ

หมายเหตุ: โรงเรือนที่ 1 โรงเรือนควบคุม (เห็ดขอนขาว)
โรงเรือนที่ 2 โรงเรือนควบคุม (เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา)
โรงเรือนที่ 3 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ด (0.1% w/v) ก่อนการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา
โรงเรือนที่ 4 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ด (0.1% w/v) หลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา
โรงเรือนที่ 5 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป (1% w/v) ก่อนการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา
โรงเรือนที่ 6 เห็ดขอนขาว+ไรไข่ปลา+ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป (1% w/v) หลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการพัฒนารูปแบบแบคทีเรียร่วมอาศัยในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (*Xenorhabdus stockiae* PB09) ให้อยู่ในรูปของแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เหมาะสมและทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาศัตรูเห็ดขอนขาวในสภาวะห้องปฏิบัติการและโรงเรือน เพื่อให้ได้ข้อมูลของชีวภัณฑ์ต้นแบบในการนำไปประยุกต์ใช้ควบคุมไรศัตรูเห็ดในโรงเรือนเพาะเห็ดของเกษตรกรในสภาวะการเพาะปลูกจริงได้ จากผลการวิจัยสรุปได้ดังนี้

การศึกษารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่เหมาะสมในการทำลายไรไข่ปลา จำนวน 3 สูตร พบว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผงละลายน้ำ (wettable powder; WP) แบบน้ำเซลล์แขวนลอย (liquid cell pellet ; LC) และแบบน้ำส่วนใสที่ผ่านการกรอง (liquid supernatant; LS) มีประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาที่สูงเท่ากับ 90.25, 86.50 และ 92.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) นาน 60 วัน พบว่าจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตและประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูปมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษา สภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูป คืออุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยที่ระยะเวลาการเก็บรักษานาน 60 วัน แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผง WP ยังคงส่งผลให้เกิดอัตราการตายของไรไข่ปลาสูง เท่ากับ 68.08 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบน้ำ LC (65.44 เปอร์เซ็นต์) และแบบน้ำ LS (62.08 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่ประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูปทั้ง 3 สูตร ที่เก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) มีค่าที่ต่ำ (52.17-61.83 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP มาเป็นต้นแบบในการพัฒนารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการทำลายไรไข่ปลาในระดับโรงเรือนต่อไป

การพัฒนารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ในการทำลายไรไข่ปลา โดยนำแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบผง WP มาทำการแปรผันส่วนประกอบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย สารตัวพา และสารลดแรงตึงผิว ผลการวิจัยพบว่าส่วนประกอบที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 คือ 1) เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียความเข้มข้น 10^8 โคโลนีต่อกรัม 2) สารตัวพาแป้งข้าวเจ้า

และ 3) สารลดแรงตึงผิวน้ำมันปาล์ม โดยแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่ผลิตจากส่วนประกอบแต่ละชนิดที่เหมาะสมให้อัตราการตายของไรไข่ปลาที่สูงเท่ากับ 75.56, 74.80 และ 78.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการศึกษาความคงตัวของประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่พัฒนาสูตรแล้ว (WP/CS-XS) ทำการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลามีแนวโน้มลดลง โดยสภาวะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 180 วัน มีแนวโน้มของอัตราการตายของไรไข่ปลาในช่วง 58.67-76.66 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งมีอัตราการตายของไรไข่ปลาลดลงเหลือเพียง 27.89 เปอร์เซ็นต์ หลังเก็บรักษานาน 180 วัน สอดคล้องกับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ที่มีแนวโน้มลดลง โดยมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตคงเหลือหลังการเก็บรักษานาน 180 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เท่ากับ 1.97×10^5 และ 2.80×10^3 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS เพื่อคงประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลา คืออุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งมีอายุการเก็บรักษาแบคทีเรียสำเร็จรูปนาน 120 วัน

การศึกษาประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 ที่พัฒนาแล้ว (WP/CS-XS) ในระดับโรงเรือน โดยการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ทดสอบในสภาวะการฉีดพ่นทั้งก่อนและหลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลาเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริล ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยทำการฉีดพ่น 2 ครั้งต่อสัปดาห์ พบว่าโรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ทั้งในสภาวะก่อนการแพร่ระบาดของไรไข่ปลาและหลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา ให้ผลผลิตเห็ดขอนขาวที่สูงเท่ากับ 118.88 และ 110.37 กรัมต่อก้อน และมีค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพของเห็ด (biological efficiency; %B.E.) เท่ากับ 37.15 และ 34.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับโรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริล และจากผลการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ (proximate analysis) ของเห็ดขอนขาวที่ผลิตได้จากโรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS พบว่ามีปริมาณโปรตีนรวม เยื่อใยหยาบและคาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 28.86-29.70, 11.03-11.23 และ 46.47-49.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณที่สูงกว่าเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยสารคาร์บาริลในการควบคุมไรไข่ปลาแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้การฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS และสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ดคาร์บาริลทั้งในสภาวะก่อนการแพร่ระบาดของไรไข่ปลาและหลังการแพร่ระบาดของไรไข่ปลาไม่มีผลต่อปริมาณคุณค่าทางโภชนาการของผลผลิตเห็ดขอนขาว

และจากการวิเคราะห์สารคาร์บาริลตกค้างในผลผลิตเห็ดขอนขาวด้วยเครื่อง Liquid Chromatography Mass spectrometer (LC-MS) ไม่พบสารคาร์บาริลตกค้างในเห็ดขอนขาวที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS เช่นเดียวกับผลผลิตเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนชุดควบคุมที่ไม่มีการฉีดพ่นสารคาร์บาริล จากผลการวิจัยสรุปได้ว่าแบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผงละลายน้ำ WP/CS-XS มีประสิทธิภาพในการควบคุมไรไข่ปลาศัตรูเห็ดขอนขาวได้ไม่แตกต่างกันกับสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ด ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่ปลอดภัยในการทำลายไรไข่ปลาทั้งในสภาวะห้องปฏิบัติการและโรงเรือน

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษารูปแบบแบคทีเรียสำเร็จรูปที่เหมาะสมในการผลิตสูตรของแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ควรมีการเพิ่มรูปแบบในการผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปให้มากขึ้น เช่น แบคทีเรียสำเร็จรูปแบบแคปซูลแขวนลอย แบบน้ำอิมัลชั่น และแบบเม็ดแกรนูล เป็นต้น เพื่อให้เหมาะสมกับแบคทีเรียที่ใช้ผลิตสูตรและการนำไปประยุกต์ใช้

2. การผลิตแบคทีเรียสำเร็จรูปควรเพิ่มส่วนประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นสารปกป้องเซลล์ (protectant) เพื่อเป็นการเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรีย ยืดอายุการเก็บรักษาและเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายศัตรูพืช

3. การทดสอบการควบคุมไรไข่ปลาของแบคทีเรียสำเร็จรูปในสภาวะโรงเรือนควรมีการเพิ่มจำนวนครั้งในการฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปหรือเพิ่มความเข้มข้นที่ใช้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลา

4. การนำแบคทีเรียสำเร็จรูปในการวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้ ควรใช้ในสภาวะป้องกันการแพร่ระบาด คือฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูปลงบนก้อนเห็ดก่อนพบการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา และควรทำการฉีดพ่นในช่วงเย็นเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียสำเร็จรูปในการทำลายไรศัตรูเห็ด

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์, พรทิพย์ วิสารทานนท์, ฉัตรไชย ศฤงฆไพบูลย์ และสัจจะ ประสงค์ทรัพย์. (2544). *แมลง-ไรศัตรูเห็ดประเทศไทย*. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์คุรุสภา ลาดพร้าว.

จิรายุ สาอุตม์.(2557). *การพัฒนาสูตรอาหารสำหรับแบคทีเรีย Xenorhabdus* sp. *และประสิทธิภาพของ สารเมทาโบไลท์ในการควบคุมไรเห็ดและจุลินทรีย์บางชนิด.* วิทยานิพนธ์ . ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม .

เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์. (2546). *แมลงและศัตรูเห็ด*. กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัย พัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

นันทินี ศรีจุมปา และ ศิรากานต์ ขยันการ. (2553). *การใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อการผลิตเห็ด*. เห็ดไทย, 61-68.

นิพนธ์ ทวีชัย. (2538). *งานวิจัยในปัจจุบันด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ*. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย กรมวิชาการเกษตร.

ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และกิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. (2537). *เทคโนโลยีการเพาะเห็ด*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ปิยรัตน์ นามเสนา.(2553). *ประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลา (Luciaphorus perniciosus* Rack.) *ของแบคทีเรีย Xenorhabdus* sp. *ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและสารเคมี Ethyl Methane Sulfonate*. วิทยานิพนธ์ . วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต . มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ฝ่ายข้อมูลเครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช. (2560). ข้อมูลพื้นฐานสารเคมีกำจัดศัตรูพืช. Retrieved June 30, 2561, from https://www.thaipan.org/topic/stat

วานิด รอดเนียม (2552) *การคัดเลือกและการเตรียมสูตรสำเร็จ Bacillus subtilis เพื่อควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจาก Alternaria longipes ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

หริพันธุ์ สมนิล, ทัศนุพันธุ์ กุศลสถิตย์, และปัณณวิชญ์ เย็นจิตต์. (2560). ผลของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ท้องถิ่นในการควบคุมโรคราดำของเห็ดนางฟ้าภูฐาน. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาตินเรศวรวิจัย ครั้ง ที่ 13 : วิจัยและนวัตกรรม ขับเคลื่อนเศรษฐกิจและสังคม*. พิษณุโลก. หน้า 368-376.

อภิชาต ศรีสะอาด และจันทรา อู่สุวรรณ. (2556). *นวัตกรรมใหม่และแบบอย่างการเพาะเลี้ยงเห็ดถุงทำเงิน*. กรุงเทพฯ: นาคา อินเตอร์มีเดีย.

อวบ สารถ้อย. (2540). *เทคโนโลยีการใช้สารกำจัดศัตรูพืช*. กรุงเทพฯ: ศูนย์หนังสือมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abd El-Kareem, S. M., El-Akad, A. S., Hussein, M. A., El-Banna, A. A., Fahmy, A. R. & Bekheit, H. K. (2010). Effect of interaction of bioinsecticides and a carbamate insecticide on the larvae of the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) by successive. *Egypt. Acad. J. Biol. Sci*, 3(2), 11–17.

Advinda, L. (2014). *Pseudomonas fluorescent* preservation using tapioca and rice flour carrier and the addition of glycerol stabilizer. In *Proceeding of international conference on research, implementation and education of mathematics and sciences*, (pp. 61-66). Yogyakarta State University, Indonesia.

Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Camacho, M. & Temprano, F. J. (2008). Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2771–2779.

AOAC. (1990). *Official method of analysis* (15th ed.). Arlington, VA, USA: Association of official analytical chemists.

Ardakani, S. S., Heydari, A., Khorasani, N. & Arjmandi, R. (2010). Development of new bioformulations of *Pseudomonas fluorescens* and evaluation of these products against damping-off of cotton seedlings. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 83–88.

Arthurs, S. P., Lacey, L. A. & De La Rosa, F. (2008). Evaluation of a granulovirus (PoGV) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* for control of the potato tuberworm (Lepidoptera: Gelechiidae) in stored tubers. *Journal of Economic Entomology*, 101(5), 1540–1546.

Bode, H. B. (2009). Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Current Opinion in Chemical Biology*.

Burges, H. D. & Jones, K. A. (1998). Formulation of Bacteria, Viruses and Protozoa to Control Insects. In *Formulation of Microbial Biopesticides* (pp. 33–127). Springer Netherlands.

Bussaman, P., Sermswan, R. W. & Grewal, P. S. (2006). Toxicity of the entomopathogenic bacteria Photorhabdus and Xenorhabdus to the mushroom mite (Luciaphorus sp.; Acari: Pygmephoridae). *Biocontrol Science and Technology*, 16(3), 245–256.

Bussaman, P., Sa-Uth, C., Chandrapatya, A., Atlihan, R., Gökçe, A., Saska, P. & 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.

Bussaman, P., Sa-Uth, C., Rattanasena, P. & Chandrapatya, A. (2012). Acaricidal activities of whole cell suspension, cell-free supernatant, and crude cell extract of *Xenorhabdus stokiae* against mushroom mite (*Luciaphorus* sp.). *Journal of Zhejiang University: Science B*, 13(4), 261–266.

Bussaman, P., Sobanboa, S., Grewal, P. S. & Chandrapatya, A. (2009). Pathogenicity of additional strains of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) to the mushroom mite *Luciaphorus perniciosus* (Acari: Pygmephoridae). *Applied Entomology and Zoology*, 44(2), 293–299.

Chakravarty, G. & Kalita, M. C. (2011). Comparative evaluation of organic formulations of *Pseudomonas fluorescens* based biopesticides and their application in the management of bacterial wilt of brinjal (*Solanum melongena* L.). *African Journal of Biotechnology*, 10(37), 7174–7182.

Chou, C., Wu, M., Nurtama, B. and Lin, J. (2010). Effects of different heating treatment and storage time on formation of resistant starch from potato starch. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 44(5), 935–942.

Chung, W. C., Huang, J. W. & Huang, H. C. (2005). Formulation of a soil biofungicide for control of damping-off of Chinese cabbage (*Brassica chinensis*) caused by *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*, 32(2), 287–294.

Fadahunsi, I., Ayansina, D. and O. (2013). Biocontrol of Mushroom Spoilage Fungi and Aflatoxin Evaluation During Storage, *Nature and Science*, 11(7), 7–13.

Fillinger, S., Chaveroche, M. K., van Dijck, P., de Vries, R., Ruijter, G., Thevelein, J. & d'Enfert, C. (2001). Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 147(7), 1851–1862.

Forst, S., Dowds, B., Boemare, N. & Stackebrandt, E. (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual Review of Microbiology*, 51(1), 47–72.

Forst, S. & Nealson, K. (1996). Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiological Reviews*, 60(1), 21-43.

Fravel, D. R., Connick, W. J. & Lewis, J. A. (1998). Formulation Of Microorganisms To Control Plant Diseases. In *Formulation of Microbial Biopesticides* (pp. 187–202). Springer Netherlands.

Fuentes-Zaragoza, E., Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández-Lõpez, J. & Pérez-Alvarez, J. A. (2011). Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch/Staerke*, 63(7), 406–415.

Gasic, S. & Tanovic, B. (2013). Biopesticide formulations, possibility of application and future trends. *Pesticidi i Fitomedicina*, 28(2), 97–102.

Giri, S., Mandal, S. C. & Acharya, K. (2013). Proximate analysis of three wild edible mushrooms of West Bengal, India. *International Journal of PharmTech Research*, 5(2), 365–369.

González-Cabrera, J., Mollá, O., Montón, H. & Urbaneja, A. (2011). Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *BioControl*, 56(1), 71–80.

Goodrich-Blair, H. & Clarke, D. J. (2007). Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Two roads to the same destination. *Molecular Microbiology*. 64(2), 260-268.

Herrmann, L. & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 8859–8873.

Hu, X., Roberts, D. P., Xie, L., Maul, J. E., Yu, C., Li, Y., Jiang, M., Liao, X., Che, Z. & Liao, X. (2014). Formulations of *Bacillus subtilis* BY-2 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in the field. *Biological Control*, 70, 54–64.

I. O. Okoro. (2012). Proximate and mineral analysis of some wild edible mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, 11(30), 7720–7724.

Kandibane, M., Kumar, K. & Adiroubane, D. (2010). Effect of *Bacillus thuringiensis* berliner formulation against the rice leaf folder *Cnaphalocrocis medinalis* Guenee (Pyralidae: Lepidoptera). *Journal of Biopesticides*, 3(2), 445–447.

Kaya, H. K. & Stock, S. P. (1997). Techniques in insect nematology. In L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology* (pp. 281–324). London: Academic Press.

Kaya, Harry K. & Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic Nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38(1), 181–206.

Kumar, V., Chandra, A. & Singh, G. (2011). Efficacy of fly-ash based bio-fertilizers vs perfected chemical fertilizers in wheat (*Triticum aestivum*). *International Journal of Engineering, Science and Technology*, 2(7), 31–35.

Lee, J. P., Lee, S. W., Kim, C. S., Son, J. H., Song, J. H., Lee, K. Y., Kim, H.J., Jung, S.J. & Moon, B. J. (2006). Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 37(3), 329–337.

Leulier, F., Parquet, C., Pili-Floury, S., Ryu, J. H., Caroff, M., Lee, W. J., Mengin-Lecreulx, D. & Lemaitre, B. (2003). The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nature Immunology*, 4(5), 478–484.

Lunn, J. & Buttriss, J. L. (2007). Carbohydrates and dietary fibre. *Nutrition Bulletin*, 32(1), 21–64.

Mahar, A. N., Jan, N. D., Mahar, G. M. & Mahar, A. Q. (2008). Control of insects with entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila* and its toxic secretions. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10(1), 52–56.

Mahar, A. N., Munir, M., Elawad, S., Gowen, S. R. & Hague, N. G. M. (2005). Pathogenicity of bacterium, *Xenorhabdus nematophila* isolated from entomopathogenic nematode (*Steinernema carpocapsae*) and its secretion against *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Zhejiang University: Science*, 6B(6), 457–463.

Manikandan, R., Saravanakumar, D., Rajendran, L., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2010). Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control*, 54(2), 83–89.

Matzen, N., Heick, T. M. & Jørgensen, L. N. (2019). Control of powdery mildew (*Blumeria graminis* spp.) in cereals by Serenade ® ASO (*Bacillus amyloliquefaciens* (former subtilis) strain QST 713). *Biological Control*, 139, 104067, 1-8.

Meng, X., Yu, J., Yu, M., Yin, X. & Liu, Y. (2015). Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast disease. *Biological Control*, 85, 46–51.

Muis, A. (2016). Biomass production and formulation of *Bacillus subtilis* for biocontrol. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 7(2), 51-56.

Mwamburi, L. A., Laing, M. D. & Miller, R. (2011). Laboratory and field evaluation of formulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a feed additive and using topical applications for control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae in caged-poultry manure. *Environmental Entomology*, 40(1), 52–58.

Nakkeeran, S., Fernando, W. G. D. & Siddiqui, Z. A. (2006). Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. *In PGPR*: Biocontrol and Biofertilization (pp. 257–296). Springer Netherlands.

Nielsen-LeRoux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D. & Givaudan, A. (2012). How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Current opinion in microbiology,* 15(3), 220-231.

Nwanze, P. I., Khan, A. U., Ameh, J. B. & Umoh, V. J. (2006). Nutritional studies with *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer and *Psathyrella atroumbonata* Pegler: I. Animal assay. *African Journal of Biotechnology*, 5(5), 457–460.

Owuama, C. I. (2001). Entomopathogenic symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of nematodes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(5), 505–515.

Peeran, M. F., Krishnan, N., Thangamani, P. R., Gandhi, K., Thiruvengadam, R. & Kuppusamy, P. (2014). Development and evaluation of water-in-oil formulation of *Pseudomonas fluorescens* (FP7) against *Colletotrichum musae* incitant of anthracnose disease in banana. *European Journal of Plant Pathology*, 138(1), 167–180.

Phiromtan, M., Mala, T. & Srinives, P. (2013). Effect of various carriers and storage temperatures on survival of *Azotobacter vinelandii* NDD-CK-1 in powder inoculant. *Modern Applied Science*, 7(6), 81–89.

Radja Commare, R., Nandakumar, R., Kandan, A., Suresh, S., Bharathi, M., Raguchander, T. & Samiyappan, R. (2002). *Pseudomonas fluorescens* based bio-formulation for the management of sheath blight disease and leaffolder insect in rice. *Crop Protection*, 21(8), 671–677.

Rekha, P. D., Lai, W. A., Arun, A. B. & Young, C. C. (2007). Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresource Technology*, 98(2), 447–451.

Ruiu, L., Mannu, R., Falchi, G., Braggio, A. & Luciano, P. (2013). Evaluation of different *Bacillus thuringiensis* sv *kurstaki* formulations against *Lymantria dispar* and *Malacosoma neustria* larvae infesting *Quercus suber* treesr trees. *Redia*, 96, 27-31.

Sabaratnam, S. & Traquair, J. A. (2002). Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biological Control*, 23(3), 245–253.

Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W. & Jackson, M. A. (2004). Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology*, 94(11), 1267–1271.

Senthilraja, G., Anand, T., Durairaj, C., Raguchander, T. & Samiyappan, R. (2010). Chitin-based bioformulation of *Beauveria bassiana* and *Pseudomonas fluorescens* for improved control of leafminer and collar rot in groundnut. *Crop Protection*, 29(9), 1003–1010.

Sheets, J. J., Hey, T. D., Fencil, K. J., Burton, S. L., Ni, W., Lang, A. E., Benz, R. & Aktories, K. (2011). Insecticidal toxin complex proteins from *Xenorhabdus nematophilus:* Structure and pore formation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(26), 22742–22749.

Solanki, M. K., Yandigeri, M. S., Kumar, S., Singh, R. K. & Srivastava, A. K. (2019). Co-inoculation of different antagonists can enhance the biocontrol activity against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Antonie van Leeuwenhoek,* 1-12.

Suryadi, Y., Susilowati, D. N., Riana, E. & Mubarik, N. R. (2013). Management of rice blast disease (*Pyricularia oryzae*) using formulated bacterial consortium. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(5), 349–357.

Tamez-Guerra, P., McGuire, M. R., Behle, R. W., Shasha, B. S. & Galn Wong, L. J. (2000). Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis* . *Journal of Economic Entomology*, 93(2), 219–225.

Tamreihao, K., Ningthoujam, D. S., Nimaichand, S., Singh, E. S., Reena, P., Singh, S. H. & Nongthomba, U. (2016). Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. *Microbiological Research*, 192, 260–270.

Thomas A N, G. M., George, D. & Poinar, J. R. (1979). Bacteria of the Family Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 29(4), 352-360.

Usta, C. (2013). Microorganisms in Biological Pest Control - A Review (Bacterial Toxin Application and Effect of Environmental Factors). In *Current Progress in Biological Research*. InTech Publishing, pp. 287-317.

Wang, Y. H. & Zhang, X. (2007). Influence of agitation and aeration on growth and antibiotic production by *Xenorhabdus nematophila*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(2), 221–227.

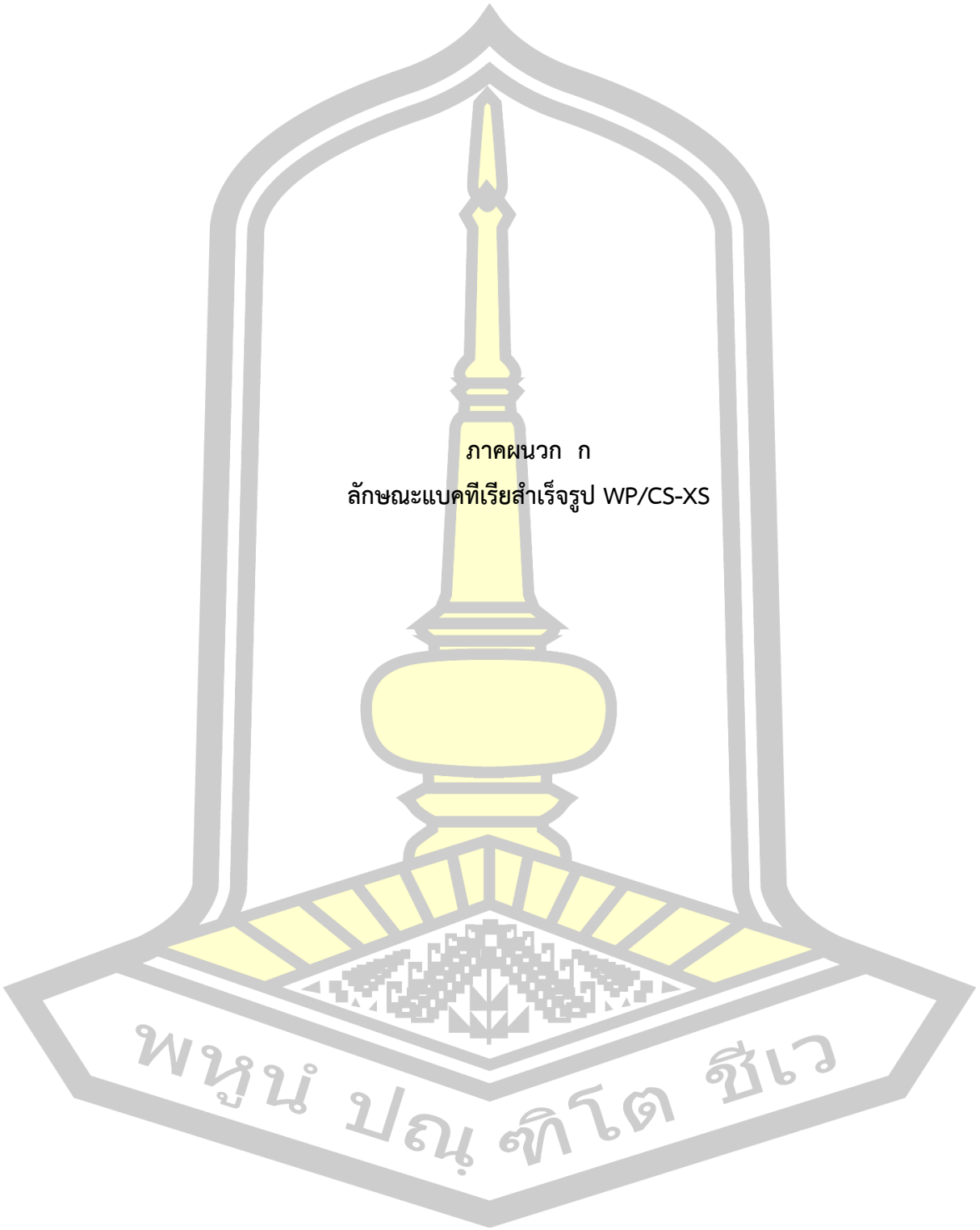
Wiwattanapatapee, R., Chumthong, A., Pengnoo, A. & Kanjanamaneesathian, M. (2007). Effervescent fast-disintegrating bacterial formulation for biological control of rice sheath blight. *Journal of Controlled Release*, 119(2), 229–235.

Wiwattanapatapee, R., Chumthong, A., Pengnoo, A. & Kanjanamaneesathian, M. (2013). Preparation and evaluation of *Bacillus megaterium*-alginate microcapsules for control of rice sheath blight disease. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(8), 1487–1497.

Wiwattanapatapee, R., Pengnoo, A., Kanjanamaneesathian, M., Matchavanich, W., Nilratana, L. & Jantharangsri, A. (2004). Floating pellets containing bacterial antagonist for control sheath blight of rice: Formulations, viability and bacterial release studies. *Journal of Controlled Release*, 95(3), 455–462.

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

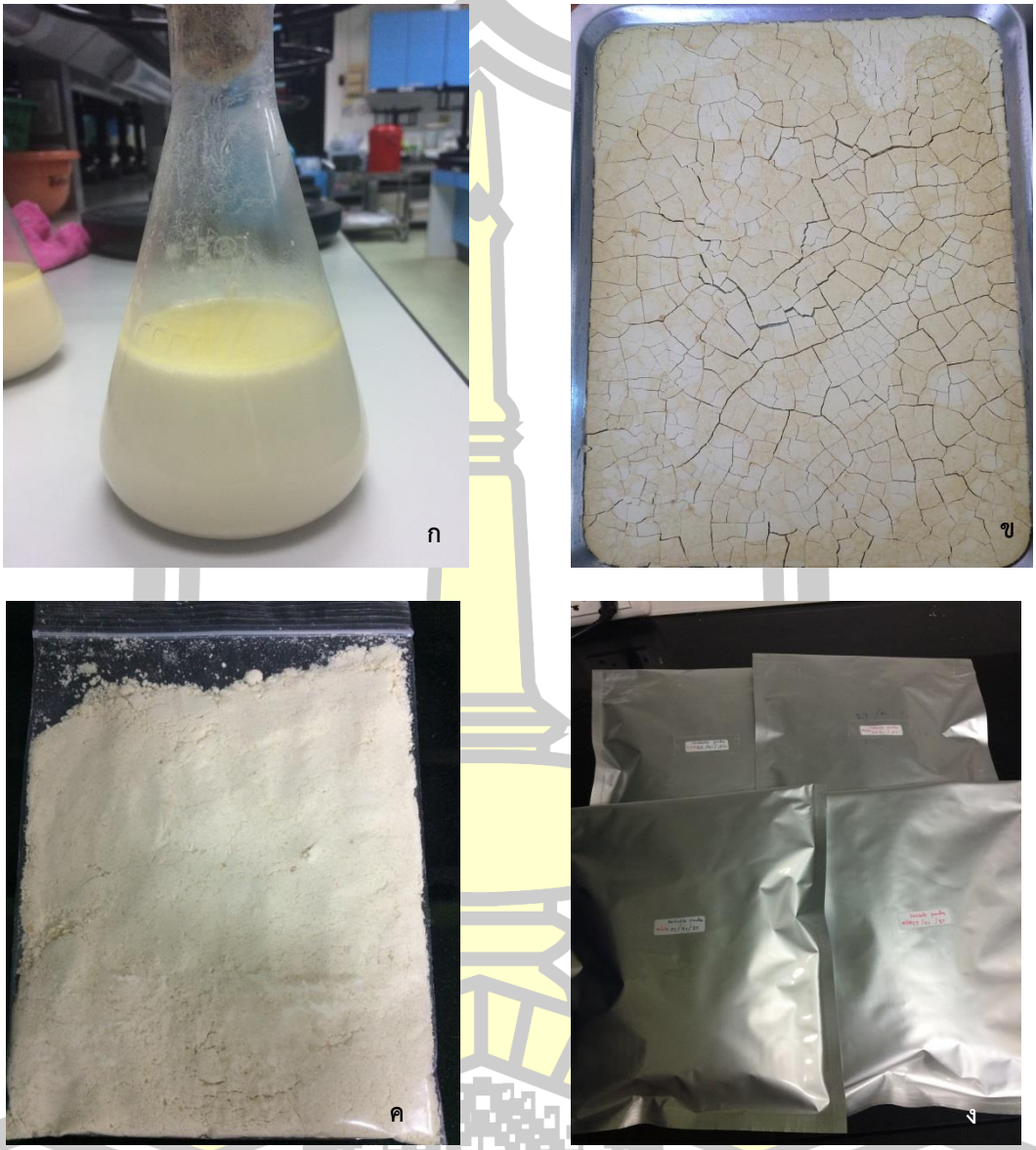
ภาคผนวก



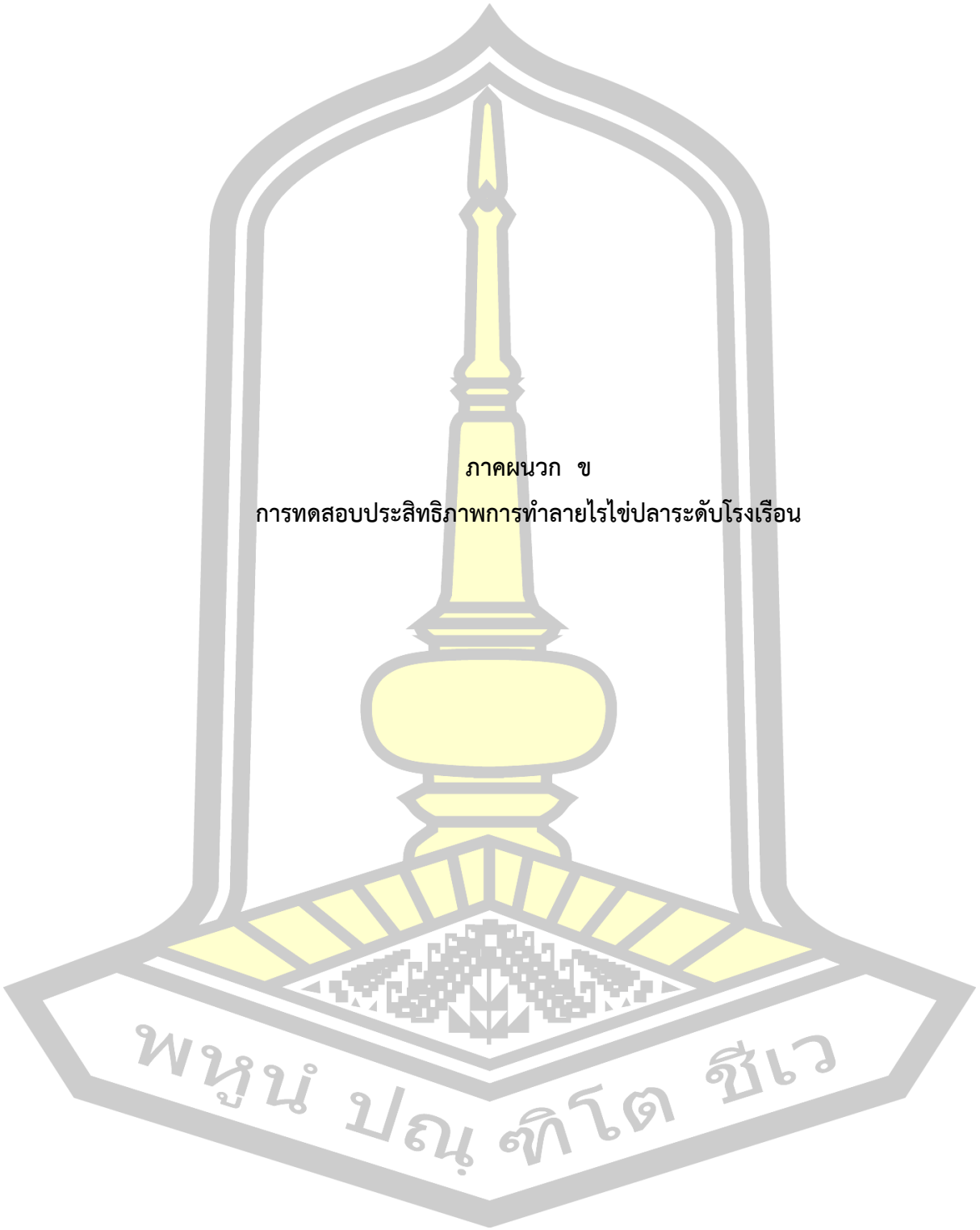
ภาคผนวก ก

ลักษณะแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS

ลักษณะแบคทีเรียสำเร็จรูป WP/CS-XS ที่ผลิตได้



ภาพประกอบที่ 10 แบคทีเรียสำเร็จรูป *X. stockiae* PB09 แบบผงละลายน้ำ (WP/CS-XS)
เมื่อ; ก คือ เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. stockiae* PB09 ผสมกับส่วนประกอบในการผลิตสูตร
ข คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปหลังการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส
ค คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปหลังการบดและกรองผ่านตัวกรองขนาด 200 mesh
ง คือ แบคทีเรียสำเร็จรูปในบรรจุภัณฑ์ทึบแสง

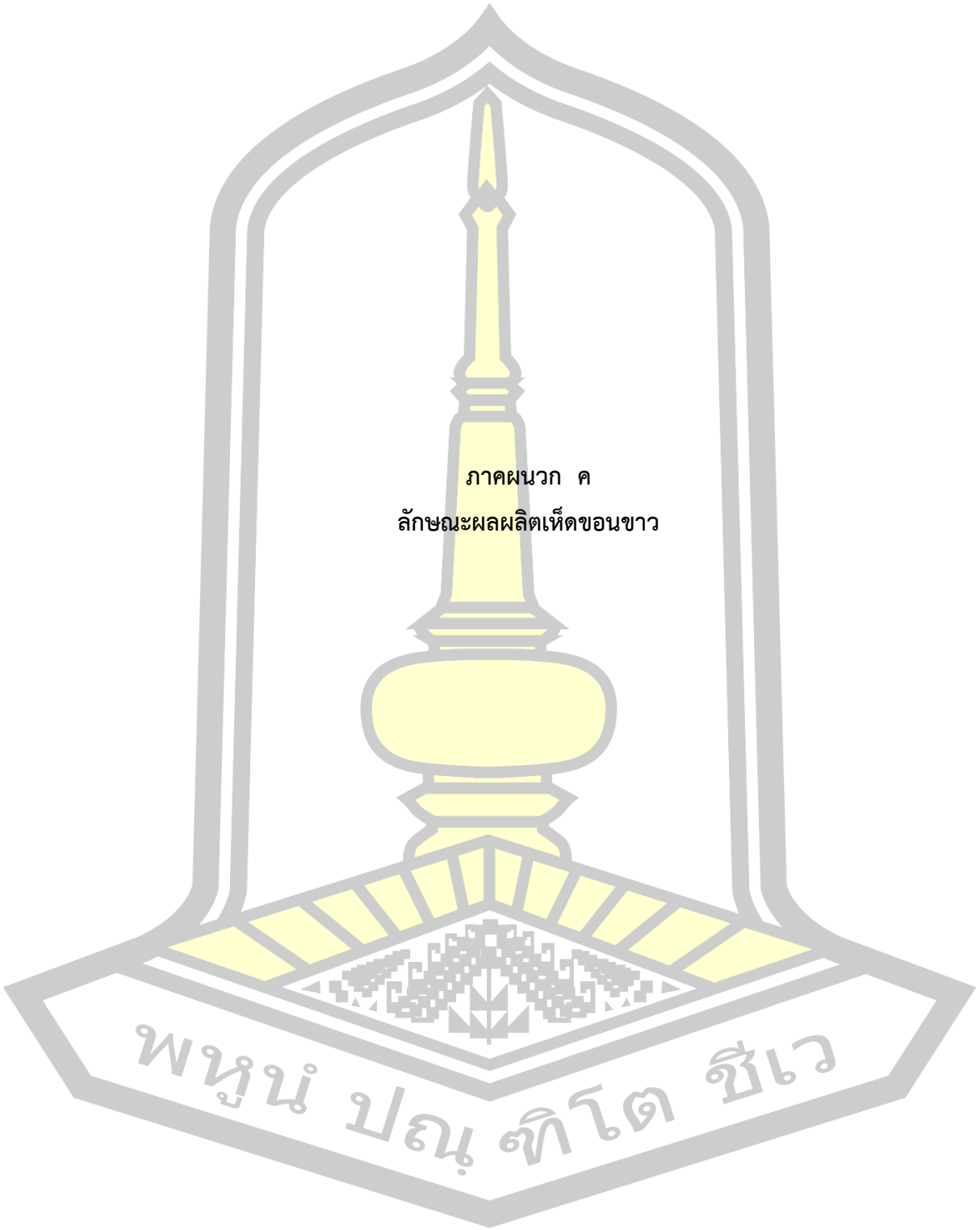


ภาคผนวก ข

การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาระดับโรงเรือน

การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาระดับโรงเรือน

ภาพประกอบที่ 11 การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายไรไข่ปลาระดับโรงเรือน
เมื่อ; ก คือ การเตรียมแบคทีเรียสำเร็จรูป; ข คือ อุปกรณ์ฉีดพ่นแบคทีเรียสำเร็จรูป
ค คือ ลักษณะโรงเรือนทดสอบ; ง คือ การเปิดปากถุงก้อนเห็ดขอนขาว
จ คือ การเขี่ยไรไข่ปลาลงในก้อนเห็ดขอนขาว; ฉ คือ การเก็บผลผลิตเห็ดขอนขาว



ภาคผนวก ค

ลักษณะผลผลิตเห็ดขอนขาว

ลักษณะผลผลิตเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบ

ภาพประกอบที่ 12 ลักษณะผลผลิตเห็ดขอนขาว

เมื่อ; ก-ข คือ เห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบด้วยแบคทีเรียสำเร็จรูป

ค-ง คือ เห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบด้วยสารเคมีกำจัดไรศัตรูเห็ด

จ คือ เห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบชุดควบคุม (ไม่มีไรไข่ปลา ไม่ใช้สารเคมี)

ฉ คือ เห็ดขอนขาวจากโรงเรือนทดสอบชุดควบคุม (มีไรไข่ปลา ไม่ใช้สารเคมี)

ภาพประกอบที่ 13 ลักษณะผลผลิตเห็ดขอนขาวที่ถูกทำลายโดยไรไข่ปลา

เมื่อ; ก-ข คือ การแพร่ระบาดของไรไข่ปลาระยะตั้งท้องบนก้อนเห็ดขอนขาว

ค-ง คือ ก้อนเห็ดและดอกเห็ดขอนขาวจากโรงเรือนที่เกิดการแพร่ระบาดของไรไข่ปลา

จ-ซ คือ ลักษณะเห็ดขอนขาวที่แคระแกร็นไม่สมบูรณ์จากการทำลายของไรไข่ปลา

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวปิยรัตน์ นามเสนา
วันเกิด	วันที่ 14 กันยายน พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	จังหวัดสกลนคร ประเทศไทย
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 46 หมู่ 1 ตำบลหนองสูงเหนือ อำเภอหนองสูง จังหวัดมุกดาหาร 49160
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	อาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม 80 ถนนนครสวรรค์ ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2543 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนหนองสูงสามัคคีวิทยา อำเภอหนองสูง จังหวัดมุกดาหาร พ.ศ. 2546 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนธาตุนารายณ์วิทยา อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร พ.ศ. 2550 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2553 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.ม.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2563 ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปร.ด.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	ทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ของนิสิตระดับปริญญาเอก คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2559
ผลงานวิจัย	1.Namsena, P. Bussaman and Rattanasena, P. 2015. Bioformulation of Xenorhabdus stockiae PB09 for Controlling Mushroom Mite, Luciaphorus perniciosus Rack. Asian Congress on Biotecnology 2015 (ACB2015) Kuala Lumpur, Malaysia, November 15-19th, 2015. (Oral presentation)

2.Namsena, P. Bussaman and Rattanasena, P. 2016. Bioformulation of Xenorhabdus stockiae PB09 For Controlling Mushroom Mite,, Luciaphorus perniciosus Rack. Bioresour. Bioprocess. 3(19):1-7.