**ชุดโครงการวิจัย** วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

**โครงการวิจัย** วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี

**กิจกรรม 2** การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช

**กิจกรรมย่อย 2.1** การผลิตและการใช้ไวรัส NPV ควบคุมแมลงศัตรูพืช

**ชื่อการทดลอง** **การพัฒนารูปแบบชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี สำเร็จรูปเพื่อกำจัดหนอนกระทู้หอม**

The Bioproduct Development of Nucleopolyhedrovirus formulations for Controlling Beet armyworm


**คณะผู้ดำเนินงาน**

**หัวหน้าการทดลอง** สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

**ผู้ร่วมงาน** ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นันทนัช พินศรี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

อิศเรส เทียนทัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช


## บทคัดย่อ


การพัฒนาชีวผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปไวรัส เอ็นพีวี ในรูปผงละลายน้ำ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยให้ชีวผลิตภัณฑ์มีความสะดวกในการใช้และเก็บรักษา และยังมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมหนอนกระทู้หอม โดยทำการการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช นำเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม ความเข้มข้น $1x10^9$ ผลึกโปรตีนต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง นำไปทดสอบความทนทานต่ออุณหภูมิที่ระดับต่างๆ ได้แก่ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่ผ่านการทดลองแล้วทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อด้วยวิธี Feeding method กับหนอนกระทู้หอมวัย 3 แล้วจึงพัฒนาสูตรผงสำเร็จรูปด้วยสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Mixture design ศึกษาส่วนผสมหรือปัจจัย 3 ปัจจัย ได้แก่ skim milk, kaolin และ surfactant A ช่วงการศึกษาปัจจัยประกอบด้วย skim milk ร้อยละ 30-40, kaolin ร้อยละ 15-30 และ surfactant A ร้อยละ 30-50 เมื่อได้อัตราส่วนที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการผลิตด้วยการนำส่วนผสมทั้งหมดผสมเข้าด้วยกัน นำไปอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 ชม. แล้วนำไปบดละเอียดเป็นชีวผลิตภัณฑ์รูปผง ทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี Feeding method กับหนอนกระทู้หอมวัย 3 จำนวน 30 ตัวต่อกรรมวิธี ผลการศึกษาพบว่า เชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม สามารถทนทานต่ออุณหภูมิได้สูงสุดถึง 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชม. โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อ 80.95 และ 85.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนผสมที่เหมาะสมในการผลิตชีวผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปส่วนผสมชีวผลิตภัณฑ์ประกอบด้วยปริมาณหางนมร้อยละ 35-36, ปริมาณ Kaolin ร้อยละ 29-30 และปริมาณ Surfactant ร้อยละ 48-50 เมื่อนำชีวผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปนี้ไปทดสอบประสิทธิภาพพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชีวผลิตภัณฑ์มาตรฐานของกรมวิชาการเกษตรไวรัส เอ็นพีวี DOA BIO v1 โดยมีมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 98.0 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

**คำหลัก :** ไวรัสเอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม, ชีวผลิตภัณฑ์, หนอนกระทู้หอม


## ABSTRACT

The development of NPV virus in the form of a soluble powder was a more convenient alternative for the usage and storage of biological product as well as a highly effective control of beet armyworm. The experiments were conducted in Entomology and zoology group, Plant protection Research and development office. First, *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV) with concentratation of $1x10^9$ PIB/ml. were put in vitro to test the temperature tolerance at 30, 40 and 50 °C for 24, 48 and 72 hours. Then, NPV virus from the experiment were tested by using feeding method to assess their infection efficacy with the 3$^{rd}$ instar larvae of beet armyworm. After that, the development of powder mixtures were designed; different kinds of additives were incorporated to enhance the efficacy of the products. The study of mixture design combination included skim milk, kaolin and surfactant A. By applying 30-40 percent skim milk, 15-30 percent kaolin and 30-50 percent surfactant A, the study revealed the most suitable formula for the powder mixture. The calculated mixture were produced and dried in the hot air oven at the temperature of 50 °C for 6 hours, and then, grounded into a powder product. The developed product examined for its performance through feeding method with 30 of 3$^{rd}$ instar beet armyworm larvae per treatment. The result showed that SeNPV could withstand temperature up to 50 °C for 24 hours. Mortality percentage of larvae was 80.95 percent while the Original activities remainding percentage was 85.89 percent. The suitable ingredients for the production of ready-mix. Bioproduct comprised of 35-36 percent skim milk, 29-30 percent kaolin and 48-50 percent surfactant A. However, the performance testing of this finished bioproduct showed no statistical difference with the DOA BIO v1, the standard bioproduct of Department of Agriculture, with average of 98.0 and 100 percent mortality of larvae, respectively.


**Key word:** *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV), Bioproduct, Beet armyworm**,** Feeding method, Mixture design, Original activities remainding percentage

## คำนำ

การผลิตชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี นอกจากต้องผลิตเชื้อให้มีความเข้มข้นและมีคุณภาพตรงตามมาตรฐานแล้ว ยังต้องคำนึงถึงสูตรสำเร็จรูปก่อนบรรจุในบรรจุภัณฑ์เพื่อนำไปวางจำหน่ายหรือแจกจ่าย เนื่องจากไวรัส เอ็นพีวี ผลิตจากตัวหนอนซึ่งเป็นแมลงอาศัยโดยตรง ประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวี จะคงที่อยู่ได้นานเพียงใดขึ้นอยู่กับการทำสูตรสำเร็จ (formulation) ซึ่งโดยหลักการผลิตจุลินทรีย์กำจัดแมลงนั้น

จุลินทรีย์ที่ผลิตได้ควรเก็บไว้ได้นานเกินกว่า 12 เดือน (Hunter-Fujita et al.,1998 ) ดังนั้นการพัฒนาส่วนผสมต่างๆ ของไวรัส เอ็นพีวีนี้ จึงมีวัตถุประสงค์หลายประการ อาทิ เพิ่มประสิทธิภาพให้กับเชื้อเมื่อนำไปฉีดพ่นในสภาพไร่ และชลอการเสื่อมสภาพของชีวผลิตภัณฑ์ให้มีอายุการเก็บยาวนานขึ้น ประการสำคัญเนื่องจากประเทศไทยมีสภาพอากาศร้อนชื้น ทำให้ชีวผลิตภัณฑ์เสื่อมสภาพได้ง่าย การวิจัยเพื่อพัฒนาสูตรสำเร็จเพื่อให้เก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี ในสภาพอากาศร้อนในประเทศไทยจึงมีความสำคัญมากกว่าประเทศที่มีอากาศเย็น อย่างในยุโรปและอเมริกา รูปแบบการทำสูตรสำเร็จที่เหมาะสมของแต่ละชนิดจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมมีส่วนสำคัญต่อการเก็บรักษาและต่อประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ (ทิพย์วดี, 2549) การใช้ Mixture design เพื่อพัฒนาหาสูตรที่เหมาะสม โดยเฉพาะกรณีส่วนผสมที่มีมากกว่า 1 ชนิด เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการหาส่วนผสมที่มีหลายชนิด โดยเฉพาะเมื่อส่วนผสมมีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน ส่วนผสมที่เหลือย่อมมีการเปลี่ยนแปลงด้วย และผลรวมทั้งหมดจะเท่ากับ 1 หรือ 100 เปอร์เซ็นต์ (ศิริลักษณ์, 2533) ดังนั้นชีวผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาสูตรสำเร็จรูปนี้ จะช่วยให้การใช้ชีวผลิตภัณฑ์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ โดยประสิทธิภาพในการทำลายแมลงศัตรูพืชไม่ลดลง เพิ่มศักยภาพในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชเมื่อเทียบกับสูตรดั่งเดิมที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน และยืดอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้น

## วิธีดำเนินการ

**อุปกรณ์**

1. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ
2. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
3. กล้องจุลทรรศน์
4. คอมพิวเตอร์และโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ
5. วัตถุดิบและสารเคมีอื่นๆ ได้แก่ เชื้อไวรัส ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV), อาหารเทียมเลี้ยงหนอน, หางนม, สารผสมหรือสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆ ได้แก่ Anti microbial, Kaolin และสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆ เป็นต้น
6. อุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า, เครื่องบด, กล่องเลี้ยงแมลง, ถ้วยพลาสติกเลี้ยงหนอน, หลอดทดลอง (vial), ขวดพลาสติกขาว, ถาดพลาสติก และถาดโลหะ เป็นต้น

**วิธีการ** แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การศึกษาคุณสมบัติไวรัส เอ็น พี วี หนอนกระทู้หอม ในสภาพอุณหภูมิต่างๆ

นำเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมมาปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ $1 \times 10^9$ ผลึกโปรตีนต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง (vial) หลอดละ 15 มิลลิลิตร นำไปวางไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ตู้ละ 3 หลอด นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำหลอดออก 1 หลอดทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่ผ่านการทดลองแล้วทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อด้วยวิธี Feeding method กับหนอนกระทู้หอมวัย 3 โดยการเคลือบเชื้อไวรัสบนผิวหน้าของอาหารเทียมถ้วยละ 15 ไมโครลิตร ให้หนอนกินถ้วยละ 1 ตัว วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ตัว รวม 80 ตัวต่อ

กรรมวิธี เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัส เอ็นพีวีที่ไม่ได้บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ และน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม (control) บันทึกจำนวนหนอนที่ตายทุกวันจนหนอนตายหรือเข้าดักแด้หมด ถ้ามีหนอนตายใน control ให้ทำการปรับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนโดยวิธี Abbott (1925) แล้วนำเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่ปรับค่ามาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> การพัฒนาสูตรผงสำเร็จรูปด้วยสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆ

วางแผนการทดลองด้วยวิธี Mixture design โดยกำหนดปัจจัยที่ทำการศึกษาแบบกำหนดช่วง (Constrained simplex lattice mixture design) ตามวิธีของ Montgomery (2005) ส่วนผสมหรือปัจจัยที่ศึกษาประกอบด้วย 3 ปัจจัย ได้แก่ skim milk, kaolin และ surfactant A มีช่วงการศึกษาปัจจัยประกอบด้วย skim milk ($X_1$) ร้อยละ 30-40 , kaolin ($X_2$) ร้อยละ15-30 และ surfactant A ($X_3$) ร้อยละ 30-50 โดย $X_1 + X_2 + X_3 = 1$ จำนวนสูตรที่ทำการศึกษาคำนวณได้จากสูตร $n = 2^q - 1$ เมื่อ n คือ จำนวนสูตร และ q คือ จำนวนส่วนผสมของสูตร ดังนั้น จำนวนจุด คำนวณจากสูตรได้เท่ากับ $2^3 – 1 = 7$ จุด และเพิ่มจุดที่ศึกษาในจุดกึ่งกลางด้านข้าง 2 จุด ได้ทั้งหมด 9 สูตร และให้ส่วนผสมอื่นมีปริมาณคงที่ในทุกสูตร

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> การผลิตสูตรสำเร็จรูปชนิดผง

เมื่อได้อัตราส่วนที่เหมาะสมในข้อ 2 แล้ว นำส่วนผมทั้งหมดผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน ปั่นช้าๆ ด้วย Blender จนเข้ากันด้วยดี นำไปใส่ถาดแผ่กระจายให้เป็นแผ่นบางๆ แล้วไปอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 ชม. จึงนำออกมาทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง บดละเอียด ก่อนบรรจุในขวดแก้วสีชา เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี Feeding method กับหนอนกระทู้หอมวัย 3 เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 1 วิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรม SPSS 10

**การบันทึกข้อมูล**

- จำนวนหนอนที่ตายจากการทดสอบในขั้นตอนต่างๆ

**เวลาและสถานที่**

**ระยะเวลา** : ตุลาคม 2553 – กันยายน 2558

**สถานที่** : ห้องปฏิบัติการอาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

## ผลการทดลองและวิจารณ์

**ขั้นตอนที่ 1** การศึกษาคุณสมบัติไวรัส เอ็น พี วี หนอนกระทู้หอม ในสภาพอุณหภูมิต่างๆ

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ ได้แก่ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อดูผลของอุณหภูมิกับระยะเวลาต่างๆต่อประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม ผลการศึกษาพบว่า เชื้อไวรัส เอ็นพีวีที่บ่มในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชม. มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเชื้อไวรัส เอ็นพีวีสด โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 92.88, 87.57 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ รองลงมาเป็นเชื้อที่บ่มในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชม. โดย

ไม่แตกต่างจากเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 ชม.และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชม. มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 85.8, 86.56, 81.45 และ 80.95 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อบ่มเชื้อไว้นานขึ้นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม. จะทำให้เชื้อไวรัสมีประสิทธิภาพลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างกับเชื้อที่บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 72.93 และ 62.01เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 72 ชม. เชื้อจะมีประสิทธิภาพต่ำสุดมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 49.08 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

**Table 1** Temperature effect to efficacy of SeNPV with different time *against Spodoptera exigua* larvae.

| Temp (°C) | Time (hr.) | % mortality1/ | % OAR2/ |
|---|---|---|---|
| **30 °C** | 24 | 92.88±0.52 a3/ | 98.56 |
| | 48 | 87.57±0.43 ab | 92.92 |
| | 72 | 85.8 ±0.62 b | 91.11 |
| **40 °C** | 24 | 86.56±0.72 b | 91.85 |
| | 48 | 81.45±0.80 bc | 86.43 |
| | 72 | 72.93±0.84 c | 77.39 |
| **50 °C** | 24 | 80.95±0.82 bc | 85.89 |
| | 48 | 62.01±0.62 c | 65.80 |
| | 72 | 49.08±0.82 d | 52.07 |
| **เชื้อสด** | - | 94.24±0.23 a | 100 |
| **น้ำกลั่น** | - | 0 e | - |
| **CV (%)** | - | 10.08 | - |

1/ เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนปรับด้วย Abbott’s formula

2/ % OAR (Original activities remainding percentage) ได้จาก อัตราส่วนเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจากอุณหภูมิต่างๆ กับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนด้วยเชื้อสด

3/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็น โดยวิธี DMRT

เมื่อพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด (Original activities remainding percentage; % OAR) จาก Table 1 ซึ่งได้จากอัตราส่วนของเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจากอุณหภูมิต่างๆ กับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนด้วยเชื้อสด พบว่าให้ผลที่สอดคล้องเช่นเดียวกับผลเปอร์เซ็นต์การตายของหนอน โดยเชื้อไวรัส เอ็นพีวี สามารถทนต่ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นานถึง 72 ชม. มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด (% OAR) ระหว่าง 91.11-98.56 เปอร์เซ็นต์ และเมื่ออุณหภูมิที่บ่มสูงขึ้นค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดก็จะลดลงตามระยะเวลาและอุณหภูมิที่สูงขึ้น มีค่า % OAR ระหว่าง 52.07-91.85 เปอร์เซ็นต์ ดังเช่นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 40 องศาเซลเซียส นาน 48 ชม. จะมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเหลือเพียง 86.43 เปอร์เซ็นต์ หรือเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 50 องศาเซลเซียส เชื้อจะอยู่ได้นานเพียง 24 ชม. มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด 85.89 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อระยะเวลานานขึ้นกว่านี้ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดก็จะลดลงต่ำกว่ามาตรฐาน เมื่อใช้มาตรฐานของประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงที่ 80 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับรายงานของ Gudauskas and Canerday (1968) ที่กล่าวถึงไวรัส เอ็นพีวีของหนอน *Heliothis* ที่เป็นหนอนในตระกูลเดียวกัน คือ Family Noctuidae จะลดประสิทธิภาพลงอย่างรวดเร็วเมื่อเชื้ออยู่ที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที และประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวีของหนอน *Trichoplusia* ลดลง 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้ที่ 80

องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิสูงมีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อไวรัสเอ็นพีวี แต่ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัสเช่นกัน

**ขั้นตอนที่ 2** การพัฒนาสูตรผงสำเร็จรูปด้วยสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆ

ผลการทดลองจาก Table 2 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนครั้งที่ 1 พบว่า สูตรที่ 1-7 มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ยระหว่าง 78.3-90.0 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 8 และ 9 มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ยระหว่าง 71.7 และ76.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนครั้งที่ 2 พบว่าทุกสูตรมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนไม่แตกต่างกัน มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ยระหว่าง 88.3-98.3 เปอร์เซ็นต์

**Table 2** Laboratory evaluation of several subtancesused as additives formulated with SeNPV and bioassayed against against *S. exigua* larvae.

| Formulation | Factor levels[1/] | | | % mortality 1 | % mortality 2 | % avg. mortality |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | | | |
| 1. | 0.30 | 0.30 | 0.40 | 85.0 a [2/] | 98.3 | 91.7 |
| 2. | 0.35 | 0.30 | 0.35 | 85.0 a | 96.7 | 90.9 |
| 3. | 0.40 | 0.30 | 0.30 | 88.3 a | 95.0 | 91.7 |
| 4. | 0.40 | 0.23 | 0.37 | 87.3 a | 94.0 | 90.7 |
| 5. | 0.40 | 0.15 | 0.45 | 90.0 a | 98.3 | 94.2 |
| 6. | 0.35 | 0.15 | 0.50 | 78.3 ab | 90.0 | 84.2 |
| 7. | 0.30 | 0.15 | 0.55 | 81.7 ab | 95.0 | 88.4 |
| 8. | 0.30 | 0.23 | 0.47 | 71.7 b | 88.3 | 80.0 |
| 9. | 0.35 | 0.23 | 0.42 | 76.7 b | 90.3 | 83.5 |
| C.V. (%) | - | - | - | 18.6 | ns | - |

1/ $X_1$ = Skim milk, $X_2$ = Kaolin, $X_3$ = Surfactant

2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ด้วยวิธี DMRT

ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรที่ระดับต่างๆใน Table 2 นำมาหาเค้าโครงส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ ด้วยการนำมาสร้างสมการถดถอย quadratic model เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ค่าประสิทธิภาพการกำจัดหนอนกับปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ ปริมาณส่วนผสมทั้ง 3 ชนิด แสดงไว้ใน Table 3

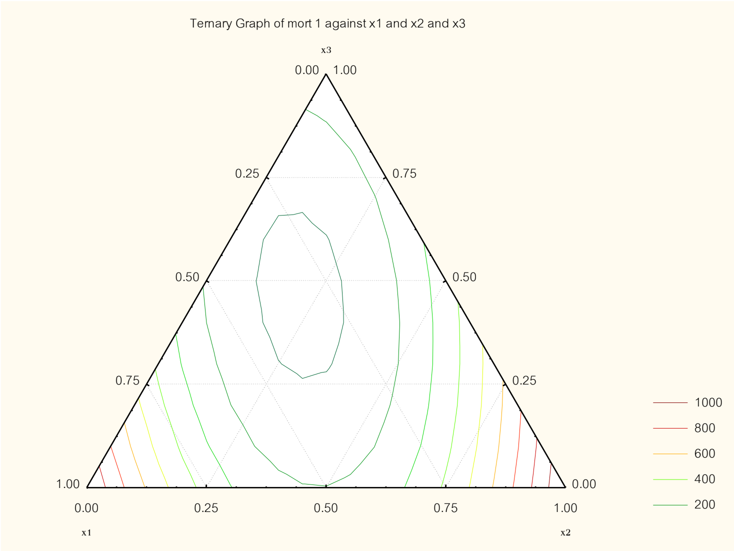
**Table 3** Predictive regression models of larvae mortality in Mixture design experiment

| Dependent variable; V | Predictive Model | $R^2$ |
|---|---|---|

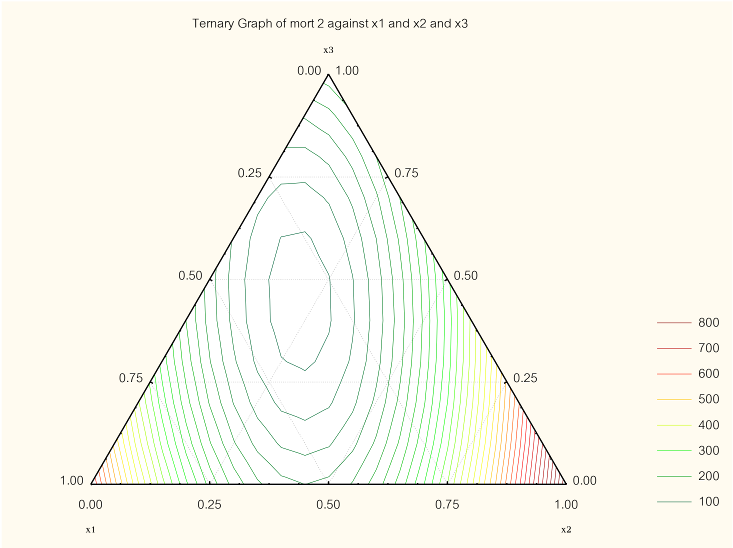
| | | |
|---|---|---|
| Mortality 1 | $V=907.76X_1+1006.08X_2+268.22X_3-3018.52X_1X_2-1600\ X_1\ X_3+1114.68X_2X_3$ | .510 |
| Mortality 2 | $V=623.05X_1+840.33X_2+210.21X_3+2265.42X_1X_2-993.33X_1X_3+840.60X_2X_3$ | .428 |
| Overall mortality | $V=8.456X_1+2.396X_2+16.808X_3+37.216\ X_1\ X_2-11.341\ X_1\ X_3+40.155\ X_2\ X_3$ | .562 |

หมายเหตุ v = Response or mortality percentage, $X_1$ = Skim milk, $X_2$ = Kaolin, $X_3$ = Surfactant A

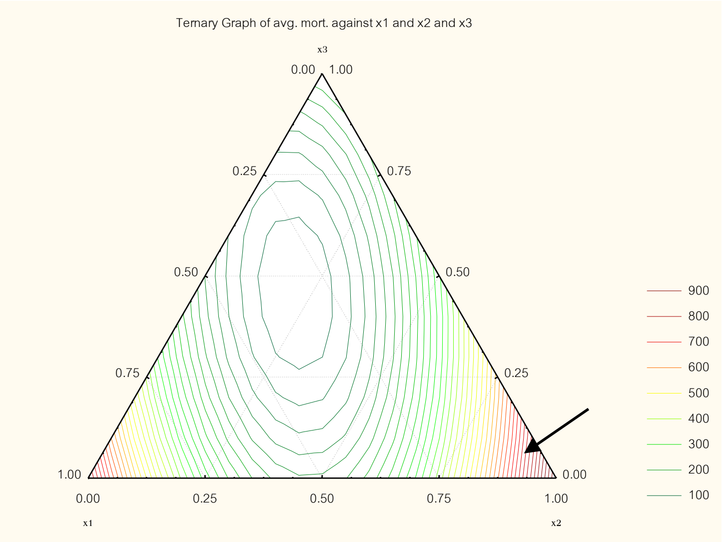
จาก Table 3 เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของแต่ละตัวแปร $x_i$ ในสมการรีเกรสชั่นพบว่า Kaolin มีค่าสัมประสิทธิ์สูงที่สุด รองลงมาคือ Skim milk และ Surfactant ตามลำดับ แสดงว่า Kaolin มีผลต่อสูตรผสมเชื้อไวรัส เอ็นพีวี มากที่สุด รองลงมาคือ Skim milk และ Surfactant ตามลำดับ เมื่อนำสมการถดถอยจาก Table 3 มาสร้างกราฟ contour plot ดังแสดงใน Fig 1 โดยเลือกจากพื้นที่ที่มีค่าคะแนน V มากที่สุดเป็นเกณฑ์กำหนดในการคัดเลือกพื้นที่ที่เหมาะสม



a) mortality 1



b) mortality 2




c) avg.mortality

**Fig.1** Contour plot for Skim milk, Kaolin, Surfactant and Optimum overlapping.

จาก Fig.1 ในกราฟ C ซึ่งเป็นกราฟที่เกิดจากการซ้อนกันของกราฟ a และ b เป็นพื้นที่ที่มีความเหมาะสมของส่วนผสมชีวผลิตภัณฑ์ ไวรัส เอ็นพีวี (จุดที่ลูกศรชี้) โดยมีปริมาณ Skim milk จะอยู่ในช่วงร้อยละ 35-36, ปริมาณ Kaolin จะอยู่ในช่วงร้อยละ 29-30 และปริมาณ Surfactant จะอยู่ในช่วงร้อยละ 48-50

**ขั้นตอนที่ 3** การผลิตสูตรสำเร็จรูปชนิดผง

เมื่อได้อัตราส่วนผสมของชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี ในขั้นตอนที่ 2 แล้ว จึงนำส่วนผสมทั้งหมดไปอบแห้ง จะได้ผลผลิตชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี ชนิดผงประมาณ 550 กรัม แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัย 3 โดยศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพไวรัส เอ็นพีวี สูตรต่างๆ ได้แก่ สูตรผง สูตรน้ำมัน เปรียบเทียบกับสูตรมาตรฐานที่ผลิตแจกจ่ายอยู่เดิมคือ ไวรัส เอ็นพีวี DOA BIO V1 ผลการทดสอบในครั้งที่ 1 พบว่า ไวรัส เอ็นพีวี ทุกสูตรมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมโดยพบว่า ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมสูตรมาตรฐาน มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนสูงที่สุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม สูตรผง สูตรน้ำมัน และเชื้อสด มีเปอร์เซ็นต์หนอนตายเฉลี่ย 96.01, 94.00 และ 92.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีควบคุมไม่พบการตายของหนอน เมื่อทำการทดลองซ้ำในครั้งที่ 2 พบว่า ทุกกรรมวิธีของการใช้ไวรัส มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์เท่ากันหมด ส่วนกรรมวิธีควบคุมไม่พบการตายของหนอนเช่นเดียวกัน (Table 4)

**Table 4** Bioassay evaluate against *S. exigua* larvae with SeNPV

| กรรมวิธี | อัตรา | เปอร์เซ็นต์หนอนตายครั้งที่ 1[1/] | เปอร์เซ็นต์หนอนตายครั้งที่ 2[1/] | เฉลี่ย |
|---|---|---|---|---|
| 1. SeNPV สูตรผง | 30 | 96.01 a [2/] | 100 | 98.0 |
| 2. SeNPV สูตรน้ำมัน | 30 | 94.00 a | 100 | 97.0 |
| 3. SeNPV (DOA BIO V1) | 30 | 100 a | 100 | 100 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 4. SeNPV เชื้อสด | 30 | 92.01 a | 100 | 96.0 |
| 5. control (น้ำกลั่น) | - | 0 b | 0 | 0 |
| C.V. (%) | | 5.79 | - | - |

1/ เปอร์เซ็นต์การตายที่ปรับค่าด้วย corrected m0rtality

2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งในแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ด้วยวิธี DMRT

**Table 5** Efficacy evaluate against Beet army worm larvae with various SeNPV bioproducts on Chinese kale

| กรรมวิธี | อัตราการใช้ต่อน้ำ 20 ลิตร | จำนวนหนอนกระทู้หอมต่อคะน้า 20 ต้น[1/] | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ก่อนพ่นสาร | หลังพ่นสารครั้งที่ 1(วัน) | | | ก่อนพ่นสาร | หลังพ่นสารครั้งที่ 2 (วัน) | | |
| | | | 3 | 5 | 7 | | 3 | 5 | 7 |
| 1. SeNPV สูตรผง | 30 | 21.25 | 17.75 a | 10.50 b | 3.00 a | 15.50 | 6.50 a | 5.50 a | 6.00 a |
| 2. SeNPV สูตรน้ำมัน | 30 | 23.00 | 17.00 a | 7.50 ab | 2.00 a | 17.50 | 6.25 a | 4.50 a | 5.75 a |
| 3. SeNPV (DOA BIO V1) | 30 | 21.25 | 14.25 a | 7.75 ab | 1.00 a | 18.75 | 5.00 a | 3.50 a | 3.00 a |
| 4. control | - | 22.00 | 39.50 b | 37.25 c | 26.25b | 18.00 | 13.50 b | 21.00 c | 17.50 c |
| C.V. (%) | | 7.01 | 9.86 | 14.08 | 18.87 | 15.07 | 22.15 | 21.34 | 26.08 |

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งในแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ด้วยวิธี DMRT

## สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนารูปแบบชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี สำเร็จรูป เพื่อพัฒนาชีวผลิตภัณฑ์ ในรูปผงละลายน้ำ พบว่า เชื้อสดไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม สามารถทนทานต่ออุณหภูมิได้สูงสุดถึง 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชม. โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอน 80.95 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อสูงถึง 85.89 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผสมที่เหมาะสมในการผลิตชีวผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปส่วนผสมชีวผลิตภัณฑ์ ประกอบด้วย ปริมาณหางนมร้อยละ 35-36, ปริมาณ Kaolin ร้อยละ 29-30 และปริมาณ Surfactant ร้อยละ 48-50 เมื่อนำชีวผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปนี้ไปทดสอบประสิทธิภาพพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชีวผลิตภัณฑ์มาตรฐานของกรมวิชาการเกษตรไวรัส เอ็นพีวี DOA BIO v1 โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนเฉลี่ย 98.0 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การผลิตไวรัส เอ็นพีวี ชนิดผงในการทดลองนี้ ผลิตในลักษณะทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนธรรมดา (Hot air oven) ที่อุณหูมิ 50$^{0}$C โดยไม่ได้ผ่านขบวนการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) ที่เคยผลิตอยู่เดิม ทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตได้อย่างมาก เพราะการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะมีต้นทุนที่สูงมาก และเครื่องมือมีราคาค่อนข้างสูง ชีวภัณฑ์ที่ได้ยังมีชีวิตรอดอยู่ได้และสามารถกำจัดแมลงได้อย่างมีประสิทธิไม่แตกต่างกัน ทำให้การผลิตชีวภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี ชนิดผง มีต้นทุนลดลงต่ำกว่าเดิม ช่วยเพิ่มโอกาสให้เกษตรกรนำไปใช้เพิ่มมากขึ้น

## การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม ชนิดผงที่มีประสิทธิภาพ มีอายุการเก็บรักษาที่นานขึ้น มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดแมลงในสภาพไร่ เพื่อเป็นมาตรฐานในการผลิตในการแข่งขันกับสารเคมีสังเคราะห์ในอนาคต
2. ได้ข้อมูลเทคนิคการพัฒนาสูตรสำเร็จรูปไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม ที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ เพื่อภาคธุรกิจเอกชนนำไปลงทุนผลิตขยายในเชิงพาณิชย์ต่อไป
3. เป็นทางเลือกที่สำคัญของระบบการผลิตเกษตรอินทรีย์ที่มีการใช้สารฆ่าแมลงสังเคราะห์
4. การผลิตเชื้อ ไวรัส เอ็นพีวี เป็นแหล่งที่นักเรียน นิสิต นักศึกษา ได้เข้ามาเรียนรู้ถึงบทบาทการนำจุลินทรีย์ ที่มีประโยชน์ไปใช้ควบคุมศัตรูพืช เรียนรู้และเข้าใจวิธีการผลิตและนำไปใช้
5. ชีวผลิตภัณฑ์นี้ สามารถช่วยลดปัญหาพิษตกค้างบนผักและผลไม้ได้เป็นอย่างดี จะช่วยเพิ่มคุณภาพและมูลค่าผักและผลไม้ที่ผลิตเพื่อบริโภคในประเทศ รวมทั้งเพื่อบริโภคในประเทศและส่งออกไปต่างประเทศ
6. สามารถผลิตไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม จากโรงงานต้นแบบไปสนับสนุนงานทดสอบสาธิตและเผยแพร่ของกรมฯ เช่น โครงการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานบนพืชเศรษฐกิจ และสนับสนุนสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขต 1 – 8 ทั่วประเทศ

## คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยปฏิบัติงานจุลินทรีย์กำจัดแมลง อาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่ให้การสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549. ไวรัสของแมลง : นิวคลีโอโพลิฮีโดรไวรัส. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 395 น.

ศิริลักษณ์ สินธวาลัย. 2533. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางโภชนาการ. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 264 น.

Gudauskas, R. T. and D. Canerday. 1968. The effect of heat, buffer salt and H-ion concentration and ultraviolet and ultraviolet light on the infectivity of *Heliothis* and *Trichoplusia* nuclear polyhedrosis viruses. J. Inverterbrate pathol. 12 (3): 405-411.

Hunter-Fujita, F.R., Enteistle, P.F., Evans,H.F. and Crook, N.E. 1998. Insect Viruses and Pest Management. John  Wiley & Sons, Inc., New York. 620 p.

Montgomery, D.C. 2005. Design and analysis of experiments. 6$^{th}$ ed. John Wiley & Sons.Inc. USA