ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช	โรคพืช
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การผลิตชีวภัณฑ์จากเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* สำหรับใช้ในแปลงผลิตทางการเกษตร

Production of *Beauveria bassiana* and *Chaetomium globosum* Bio-agent for Field Application

นามผู้วิจัย นางสาวรัชชนก ปิ่วท่าไม้

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล, Dr.sc.agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัติยา พงศ์พิสุทธา, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชนี ฮงประยูร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตชีวภัณฑ์จากเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* สำหรับใช้ในแปลงผลิตทางการเกษตร

Production of *Beauveria bassiana* and *Chaetomium globosum* Bio-agent for Field Application

โดย

นางสาวรัชชนก ปิ่วท่าไม้

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รัชชนก ปิ๋วท่าไม้ 2557: การผลิตชีวภัณฑ์จากเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* สำหรับใช้ในแปลงผลิตทางการเกษตร ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล, Dr.sc.agr. 90 หน้า

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง near UV และ cool white fluorescent นาน 14 วัน พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* ที่เลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) pH 9.0 เจริญได้ดีกว่าอาหาร PDA pH 5.5 โดยมี fructose และ KNO_3 เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่กระตุ้นให้เชื้อสร้างสปอร์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการเติมสารอาหาร สำหรับเชื้อรา *C. globosum* บนอาหาร yeast peptone agar (YPA) และ PDA ที่ผสมไคโตซาน 0.2% พบว่าเส้นใยเจริญได้มากกว่าการเลี้ยงบนอาหาร PDA โดยค่า pH 5.5-6.0 เป็นช่วงที่เหมาะต่อการเจริญ โดยมี cellulose และ asparagine ซึ่งช่วยในการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ เมื่อนำสารอาหารที่จำเป็นมาพัฒนาเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *B. bassiana* สูตร potato fructose agar ที่ผสม KNO_3 พบว่าเชื้อมีการเจริญและการสร้างสปอร์เพิ่มขึ้นมากกว่าการทดลองอื่นๆ ส่วนเชื้อรา *C. globosum* สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร potato cellulose agar ที่ผสมไคโตซาน 0.2% และพบการสร้างสปอร์มากที่สุด ผลการทดลองนี้นำไปสู่การพัฒนาอาหารเพื่อกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* เพื่อใช้ผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อไป

สำหรับการใช้วัสดุธรรมชาติเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อราให้มีปริมาณมาก พบว่า การเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* บนข้าวโพดบด ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง cool white fluorescent เป็นระยะเวลา 21 วัน จะมีความเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของเชื้อราได้ดีที่สุด และการเติมแหล่งของคาร์บอนหรือไนโตรเจนที่เหมาะสมในวัสดุธรรมชาติเพื่อกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของเชื้อราแต่จะไม่พบผลต่อการกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* แต่จะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ในช่วง 14 วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาวิธีการผลิตชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* พบว่า ชีวภัณฑ์ของเชื้อราทั้งสองชนิด ในรูปแบบผงแห้งสูตรที่มีการใช้แร่ talc เป็นสารพาผสมกับเชื้อราที่เจริญบนข้าวโพดบดซึ่งผ่านการปั่นละเอียด มีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษาความมีชีวิตของเชื้อราได้ โดยเชื้อรา *B. bassiana* ในรูปผงแห้งจะสามารถเก็บรักษาเชื้อได้ดีนานถึง 90 วัน ส่วนเชื้อรา *C. globosum* จะรักษาปริมาณเชื้อได้ดีนานถึง 120 วัน และเมื่อนำสูตรดังกล่าวมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ด เพื่อให้เกิดความสะดวกในการใช้ประโยชน์มากยิ่งขึ้น พบว่า การใช้ polyvinyl pyrrolidone K30 (PVP K30) เป็นสารจับติดมีแนวโน้มในการเก็บรักษาความมีชีวิตของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ได้ภายในระยะเวลา 30 วัน

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ratchanok Piwtamai 2014: Production of *Beauveria bassiana* and *Chaetomium globosum* Bio-agent for Field Application. Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Assistant Professor Chainarong Rattankreetakul, Dr.sc.agr. 90 pages.

The growth and sporulation stimulant substances to the beneficial fungi *Beauveria bassiana* and *Chaetomium globosum* were investigated. The purpose of this study was to develop the knowledge for biopesticide production. The result showed that *B. bassiana* mycelium on potato dextrose agar (PDA) at pH 9.0 was grew faster than on PDA pH 5.5. Fructose and KNO_3 as crucial carbon and nitrogen sources could induced higher sporulation when compared with the basal medium as control. *C. globosum*, growth on the yeast peptone agar and PDA with 0.2 % chitosan showed greater than those on PDA (control) with the optimal pH ranges of 5.5-6.0. Cellulose, as carbon source and asparagine, as nitrogen source were supporting to growth and sporulation of *C. globosum*. From the results, the modified media were developed. Potato fructose agar with KNO_3 was increased the fungal growth and sporulation for *B. bassiana* higher than other treatments. For *C. globosum*, potato cellulose agar with 0.2% chitosan was propered for growth and sporulation indicated to the greatest results compared with other treatments. The outcome of the study could be used to promote fungal spore of *B. bassiana* and *C. globosum* for the produce of biopesticide product.

Maize was found to be a good natural substance for *B. bassiana* and *C. globosum* culture to increase the quantity of mycelia and spore . The culture was set at room temperature under cool white fluorescent light for a period of 21 days which was appropriated to increase the amount of beneficial fungi . The addition of carbon or nitrogen sources show no stimulant to the amount of *B. bassiana* numbers, but they showed an effect to increase the amount of fungus *C. globosum* during the first 14 days of culture.

To production of dry formulation biopesticide of *B. bassiana* and *C. globosum* was studied. The result revealed that the blended of talc and the grinding of the infected with *B. bassiana* and *C. globosum* maize showed the good fungal viability with 90 days for *B. bassiana* and 120 days for *C. globosum*. The microbial pellet was performed with the binder polyvinyl pyrrolidone K30 (PVP K30). Both *B. bassiana* and *C. globosum* showed a good viability to 30 days of the tested period.

_____ _____ ___ / ___ / ____

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักเป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษาวิธีการดำเนินการวิจัย และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ รวมทั้งช่วยเหลือในด้านอื่นๆ เสมอมา ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัติยา พงศ์พิสุทธา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ดร. บุญญวดี จิระวุฒิ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก และ รองศาสตราจารย์ ศศิธร วุฒิวณิชย์ ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้ความกรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาทางโรคพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐมที่สนับสนุนห้องปฏิบัติการวิจัย อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการศึกษาวิจัยและขอบคุณพี่ เพื่อน น้อง เจ้าหน้าที่ และบุคลากรภาควิชาโรคพืชทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือในระหว่างการศึกษาและทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ รวมทั้งทุกคนในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

ท้ายที่สุดนี้ขอกราบขอบพระคุณบูรพาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ด้านต่างๆ ให้แก่ข้าพเจ้าตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

รัชชนก ปิ่วท่าไม้

กรกฎาคม 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	31
สรุปและข้อเสนอแนะ	75
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	77
ภาคผนวก	86
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	90

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของสารพาที่ใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์รูปแบบของเหลวสูตรต่างๆ	26
2	ส่วนประกอบของสารพาที่ใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งตามสูตรต่างๆ	27
3	ส่วนผสมของชีวภัณฑ์เชื้อรารูปแบบเม็ดที่ใช้ในการคัดเลือกชนิดของสารจับติด	29
4	ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 14 วัน	33
5	ผลของค่า pH ต่อการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* นาน 14 วัน	36
6	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน	38
7	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน	42
8	ผลของสูตรอาหารซึ่งพัฒนาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน	46
9	การเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Beauveria bassiana* บนธัญพืชชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน	51
10	การเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Chaetomium globosum* บนธัญพืชชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน	51
11	ความสามารถในการแตกตัวในน้ำของผงชีวภัณฑ์เชื้อราทั้ง 9 สูตร ภายในเวลา 5 นาที	60
12	ผลของสารจับติดแต่ละชนิดต่อความสามารถในการแตกกระจายตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบเม็ดในน้ำภายในระยะเวลา 5 นาที	68
13	ผลของสารจับติดที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 14 วัน	71

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

1 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9, 20, 40, 60, 90 และ 180 วัน 88

2 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9, 20, 40, 60, 90 และ 180 วัน 88

3 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ในชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ด เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10, 20 และ 30 วัน 89

4 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ด เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10, 20 และ 30 วัน 89

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่เจริญบนอาหารชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน	34
2	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ที่เจริญบนอาหารชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน	35
3	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่เจริญบนอาหาร basal medium 1 ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน	39
4	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ที่เจริญบนอาหาร basal medium 1 ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน	40
5	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่เจริญบนอาหาร basal medium 2 ซึ่งมีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน	43
6	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ที่เจริญบนอาหาร basal medium 3 ที่มี การเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน	44
7	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ที่เจริญบนอาหารซึ่งพัฒนาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน	47
8	ลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* บนวัสดุธรรมชาติชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 4 วัน	52
9	ลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Chaetomium globosum* บนวัสดุธรรมชาติชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 4 วัน	53
10	ลักษณะผิวหน้าของชีวภัณฑ์เชื้อรา *Chaetomium globosum* ในรูปแบบของเหลวตามสูตรต่างๆ	55
11	ลักษณะของชีวภัณฑ์เชื้อรา *Beauveria bassiana* ในรูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตร	57
12	ลักษณะของชีวภัณฑ์เชื้อรา *Chaetomium globosum* ในรูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตร	58
13	ลักษณะการแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตรในน้ำ นาน 5 นาที	61

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

14 ลักษณะการละลายของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตรในน้ำ นาน 5 นาที 62

15 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9, 20, 40, 60, 90 และ 180 วัน 66

16 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้ง ทั้ง 9 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9, 20, 40, 60, 90 และ 180 วัน 67

17 ลักษณะการแตกกระจายตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบเม็ดที่ผสมสารจับติดแต่ละชนิดในน้ำ ที่ระยะเวลา 0, 1 และ 5 นาที 69

18 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ในชีวภัณฑ์เชื้อรารูปแบบเม็ดทั้ง 4 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1, 10, 20 และ 30 วัน 73

19 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ดทั้ง 4 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1, 10, 20 และ 30 วัน 74

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การผลิตชีวภัณฑ์จากเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* สำหรับใช้ในแปลงผลิตทางการเกษตร

Production of *Beauveria bassiana* and *Chaetomium globosum* Bio-agent for Field Application

คำนำ

การใช้ประโยชน์จากเชื้อรามาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย อันเป็นผลจากความต้องการบริโภคผลผลิตเกษตรที่ปลอดสารเคมี และการพบปัญหาสารเคมีตกค้างในสภาพแวดล้อม อีกทั้งปัญหาราคาสารเคมีที่มีราคาเพิ่มขึ้นทุกปีเป็นผลให้ต้นทุนการผลิตพืชมีราคาสูงมากขึ้น ทำให้เกษตรกรมีความสนใจในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชโดยใช้การควบคุมทางชีวภาพมากขึ้น มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับเชื้อราที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ เช่น การใช้เชื้อราในกลุ่มของ *Fusarium* spp. สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคและเชื้อรา Hypovirulent binucleate *Rhizoctonia* (HBNR) ที่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ (Minuto *et al*.,1997; Muslim *et al*., 2003) การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น เชื้อรา *Sclerotium rolfsii, Rhizoctonia solani, Pythium ultimum, Colletotrichum acutatum, Botrytis cinerea* เป็นต้น (จิระเดช, 2549; Henis, 1984; Harris, 1999; Freeman *et al*., 2004) เช่นเดียวกับการใช้เชื้อรา *Chaetomium* spp. สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดได้แก่ *Pythium ultimum, Phomopsis sojae, Pyricularia oryzae, Sclerotium rolfsii* และ *Venturia inequalis* เป็นต้น (Pietro *et al*., 1992; เกษม, 2535) นอกจากจุลินทรีย์ที่ใช้เพื่อควบคุมโรคแล้ว ยังมีการใช้เชื้อราควบคุมแมลง เช่น การใช้เชื้อรา *Paecilomyces fumosoroseus* ควบคุมแมลงหวี่ขาวและเพลี้ยอ่อน (Wraight *et al*., 2000; Mesquita and Lacey, 2001) การใช้เชื้อรา *Beauveria bassiana* ควบคุมแมลงประเภทแมลงหวี่ขาว ด้วงมันฝรั่งและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เป็นต้น (Feng *et al*., 1994) และการใช้เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นสีเขียว และแมลงวันผลไม้ (เพชรหทัย และอัจฉราพร, 2550; นริศ และอนุชิต, 2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเพาะเลี้ยงเชื้อราที่มีประโยชน์มีปัจจัยที่สำคัญ คือ การเพิ่มปริมาณเชื้อราและสภาพการสร้างสปอร์ โดยที่ปริมาณของเชื้อรามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืช ดังนั้นส่วนสำคัญของการใช้เชื้อราที่มีประโยชน์คือ การพัฒนาให้ออกมาในรูปแบบหัวเชื้อราหรือสารชีวภัณฑ์เพื่อความสะดวกต่อการใช้งานและการเก็บรักษาของเกษตรกร แม้ว่าในปัจจุบันจะมีชีวภัณฑ์ของเชื้อราจำหน่ายในท้องตลาดอยู่หลายรูปแบบ แต่ปัญหาเกี่ยวกับข้อมูลวัตถุดิบหรือสารประกอบที่ใช้ในการผลิตหัวเชื้อยังไม่ชัดเจน ทำให้เกษตรกรไม่สามารถที่จะผลิตเชื้อให้เป็นชีวภัณฑ์ใช้เองได้ เนื่องจากการขาดข้อมูลรูปแบบในการผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์สำเร็จรูป งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการศึกษากรรมวิธีการผลิตหัวเชื้อราในรูปแบบชนิดแห้ง ในรูปแบบชนิดเหลว และปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาเชื้อราที่เป็นประโยชน์ซึ่งนำไปขยายผลเพื่อใช้พัฒนาเป็นวิสาหกิจชุมชนและการใช้ในแปลงผลิตของเกษตรกรต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาชนิดของแหล่งอาหาร คาร์บอนและไนโตรเจน และสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum*

2. ศึกษาสูตรผสมสำหรับการผลิตหัวเชื้อราหรือชีวภัณฑ์ในรูปแบบชนิดแห้งและชนิดเหลว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. เชื้อราที่มีการใช้ประโยชน์ในระบบควบคุมทางชีวภาพ

กลุ่มของเชื้อราที่เป็นประโยชน์ในการผลิตพืชทางการเกษตรโดยเฉพาะการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืช มีกลไกในการควบคุมทางชีวภาพต่อศัตรูพืชมี 4 ลักษณะดังนี้

1. การแข่งขันกับศัตรูพืช (Competition)

เชื้อราที่มีประโยชน์มักมีการสร้างเส้นใยเร็วหรือสามารถสร้างสปอร์ได้มากจึงสามารถแข่งขันการใช้อาหาร อากาศหรือการเจริญครอบครองพื้นที่กับศัตรูพืชได้ ทำให้สภาพการเจริญของศัตรูพืชลดลง

2. การสร้างสารปฏิชีวนะ (Antibiotic)

เชื้อราที่มีประโยชน์หลายชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ สารพิษและเอมไซม์ ไปยับยั้งหรือทำลายผนังเซลล์และส่วนขยายพันธุ์ของศัตรูพืชได้

3. การเป็นปรสิตต่อศัตรูพืช (Parasitism)

เชื้อราที่มีประโยชน์สามารถเป็นปรสิตกับศัตรูพืชได้ โดยเริ่มจากเชื้อราที่มีประโยชน์สร้างเส้นใยหรือสปอร์มาสัมผัสหรือพันรัดศัตรูพืช จากนั้นเชื้อราที่มีประโยชน์จะสร้างเอนไซม์ (lytic enzymes) ไปย่อยผนังเซลล์ของศัตรูพืชแล้วแทงเส้นใยเข้าสู่เส้นใยหรือผนังลำตัวของศัตรูพืชเพื่อดูดซับธาตุอาหารไปใช้ในการเจริญและการเพิ่มปริมาณส่งผลให้ศัตรูพืชอ่อนแอและตาย ในที่สุด

4. การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรค (Induction of resistance in plant)

เชื้อราที่มีประโยชน์บางชนิดสามารถกระตุ้นกลไกความต้านทานโรคที่แฝงตัวหรือยังไม่ทำงานในพืชให้แสดงการทำงานเพื่อไปยับยั้งการเข้าทำลายหรือการแพร่กระจายของศัตรูพืชได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวอย่างของเชื้อราที่ได้รับความนิยมเพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมทางชีวภาพสำหรับการผลิตทางการเกษตรทั้งในและต่างประเทศ อาทิเช่น

เชื้อรา *Trichoderma* spp.

เชื้อรา *Trichoderma* จัดเป็นพวก saprophyte อาศัยอยู่ในดินหรือเศษซากพืชรวมทั้งแหล่งอินทรียวัตถุต่างๆ เจริญเติบโตได้เร็ว เส้นใยมีสีขาวและสร้าง conidiophore ที่แตกกิ่งก้านอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ส่วนปลายของ conidiophore มีการสร้าง phialide รูปร่างคล้ายลูกโบว์ลิ่ง ลักษณะโคนิเดีย (conidia) หรือสปอร์ (spore) เป็นเซลล์เดียวรูปไข่โดยมีการสร้างเป็นจำนวนมากรวมกันเป็นกลุ่มก้อนด้วยสารเหนียว (slimy head) เห็นเป็นสีเขียวหรือใส บางชนิดเป็นสีเหลือง

มีรายงานการนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อโรคพืชได้หลายชนิด เช่น

Mathivanan *et al*. (2005) ศึกษาการลดการเกิดโรคกาบใบแห้งที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และเพิ่มการเจริญและผลผลิตในข้าว โดยใช้ผงเชื้อรา *Trichoderma viride* ปริมาณ 2×10^8 โคโลนีต่อกรัม และเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* ปริมาณ 3×10^8 โคโลนีต่อกรัม พบว่า การใช้เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดหรือการใช้เชื้อทั้งสองชนิดร่วมกันสามารถลดการเกิดโรคและการเพิ่มการเจริญในข้าวได้เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม นอกจากนี้ยังมีรายงานความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชชนิดอื่นได้แก่ *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. และ *Sclerotinia* spp. เป็นต้น

ในประเทศไทยนั้นมีรายงานการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. ควบคุมโรคพืชหลายชนิดเช่นเดียวกัน ได้แก่ โรคเน่าระดับดิน (damping-off) ของต้นกล้าพืชหลายชนิด ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium* spp. โรคแอนแทรคโนสของผักและผลไม้ (anthracnose) ที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โรครากเน่าและโคนเน่า (root and stem rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium solfsii* และ *Phytophthora* spp. โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ (fusarium wilt) ที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* โรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่ง (stem blight) ที่เกิดเชื้อรา *Phomopsis asparagi* โรคกาบใบแห้งของข้าว (sheath blight) ที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* เป็นต้น (จิระเดช, 2549; จิระเดช, 2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื้อรา *Chaetomium* spp.

เชื้อรา *Chaetomium* จัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycetes มีการสร้าง perithecium ที่มี sterile hypha หรือ hair ยื่นออกจากผนังด้านนอกโดยรอบ มีการสร้าง ascus รูปร่างแบบกระบอง ภายในมี 8 ascospore โดย ascospore มีลักษณะคล้ายผลมะนาว (lemon shaped) ผนังมีสีน้ำตาลหรือดำ มี 1 เซลล์ ก่อนที่ ascospore จะแก่เต็มที่ผนัง ascus จะสลายตัวและปล่อยให้ ascospore กระจายตัวจนถูกปล่อยออกจาก ostiole ไหลออกมาเป็นสาย เชื้อราชนิดนี้เจริญได้ดีบน substrate พวกกระดาษ ผ้า และเส้นใยต่างๆรวมทั้งมูลสัตว์ด้วย เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase และ xylanase (Webster and Weber, 2007) ได้ดีและยังสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น echinulin, chaetoglobosin C เป็นต้น ทำให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชได้ ดังนี้

Pietro *et al*. (1992) ได้ศึกษาบทบาทของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อรา *C. globosum* ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของ sugarbeet ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium ultimum* พบว่า สาร Chaetomin สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. ultimum* ได้

ส่วน Davis *et al*. (1992) ทดสอบการใช้เชื้อรา *C. globosum* ปริมาณ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ผสมกับสารแขวนลอย cellulose ควบคุมโรคของแอปเปิ้ล พบว่า สามารถลดการเกิดโรคขี้แมลงวัน (flyspeck) เป็นแผลจุดเล็กๆเกิดจากเชื้อรา *Zygophiala jamaicensis* และโรคปื้นดำ (sooty blotch) ที่เกิดจากเชื้อรา *Gloeodes pomigena* ได้

ในประเทศไทยนั้นก็พบรายงานการนำเชื้อรา *Chaetomium* sp. มาใช้ควบคุมโรคในพืชหลายชนิดเช่นกัน ดังนี้

เกษม (2534) ศึกษาการควบคุมโรคใบจุดของข้าวโพดหวานที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia lunata* โดยใช้เชื้อรา *C. globosum* ด้วยวิธีการ dual culture พบว่า เชื้อรา *C. globosum* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชได้ 74 เปอร์เซ็นต์ และมีบริเวณยับยั้ง 0.4 เซนติเมตร เมื่อทำการทดสอบการควบคุมโรคในสภาพเรือนทดลองพบว่า เชื้อรา *C. globosum* ลดการเกิดโรคใบจุดข้าวโพดหวานได้ดีใกล้เคียงกับการใช้สารเคมีประเภท benlate และมีแนวโน้มว่าเชื้อ *C. globosum* มีการเจริญเติบโตของพืชดีกว่าการทดลองควบคุม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุมินตรา (2540) ทดสอบการใช้ชีวภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อรา *Chaetomium* spp. และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในแปลงทดลองของเกษตรกร เพื่อป้องกันการเกิดโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ที่เกิดจากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่า เชื้อราที่มีประโยชน์ทั้งสองชนิดสามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสและลดปริมาณเชื้อก่อโรคในดินได้ดีเช่นเดียวกับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา

ต่อมาในปี พ.ศ. 2544 สุธาสินีและเกษม ได้ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Chaetomium* spp. และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรครากเน่าและแอนแทรคโนสของส้มเขียวหวานในแปลงทดลองที่พบการระบาดของโรคมาก่อน หลังการทดลองพบว่า แปลงทดลองที่ใช้ชีวภัณฑ์ของเชื้อราแต่ละชนิดและแปลงที่ใช้ชีวภัณฑ์ทั้งสองชนิดร่วมกันสามารถลดระดับการเกิดโรครากเน่าและแอนแทรคโนสได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับแปลงทดลองควบคุม

นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เชื้อรา *Chaetomium* spp. ควบคุมโรคพืชอีกหลายชนิด ได้แก่ โรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* โรคโคนเน่าของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfsii* โรครากเน่าโคนเน่าของส้ม พริกไทยดำ สตอเบอร์รี่และทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. (Soytong *et al*., 2001) โรคแอนแทรคโนสขององุ่นที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Soytong *et al*., 2005) และโรค late blight ของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อรา *P. infestans* (Soytong and Ratanacherdchai, 2005)

เชื้อรา *Beauveria* spp.

เชื้อรา *Beauveria* spp. เป็นเชื้อราที่ใช้ควบคุมแมลงที่ได้รับความนิยมชนิดหนึ่งทั้งในประเทศและต่างประเทศ คือ ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค muscardine disease กับแมลง โดยเมื่อสปอร์ของเชื้อราตกลงบนผนังลำตัวของแมลงและสภาพแวดล้อมมีความชื้นเหมาะสม สปอร์จะงอก germ tube แล้วแทงทะลุผ่านผนังลำตัวของแมลงเข้าไปในช่องว่างในลำตัวแมลง (hemocoel) เพื่อเจริญและเพิ่มปริมาณ เซลล์เม็ดเลือดจะถูกทำลายทำให้ปริมาณของเลือดในตัวแมลงลดน้อยลง ในขณะที่เชื้อราเพิ่มปริมาณมากขึ้นจนเต็มช่องว่าง แมลงจะเริ่มเป็นอัมพาตทั่วตัวและตาย เมื่อแมลงตายแล้วเชื้อราจะเจริญทะลุผ่านผนังลำตัวออกมาภายนอกแล้วสร้างสปอร์ปกคลุมลำตัวของแมลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื้อรา *Beauveria* มีการสร้างเส้นใยสีขาวฟู (fluffy) ไปจนถึงลักษณะคล้ายฝุ่นแป้ง (powdery) และสร้างสปอร์หรือ conidia ได้เป็นจำนวนมาก ลักษณะเป็นรูปทรงกลมหรือรูปไข่ สีใส มี 1 เซลล์ ก้านชูสปอร์ (conidiophore) เกิดเดี่ยวหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่มก็ได้ ฐานก้านชูสปอร์มีลักษณะโป่งออกส่วนปลายเรียว สำหรับบริเวณที่ให้กำเนิดสปอร์ที่เรียกว่า conidiogenous cell มีลักษณะเป็นซิกแซก จึงเห็นว่า สปอร์ที่สร้างขึ้นมามีลักษณะเกิดสับหว่างอยู่บนก้านเล็กๆ (denticle) เชื้อราชนิดนี้สามารถทำลายแมลงได้ทุกระยะ โดยสปอร์ของเชื้อสามารถติดไปกับไข่ของแมลงได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอมไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน ไคตินและไขมันของแมลง อีกทั้งยังสร้างสารพิษซึ่งเป็นอันตรายต่อแมลง เช่น beauvericin เป็นต้น จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้เชื้อราชนิดนี้ได้รับความนิยมในการใช้อย่างมากทั่วโลก

ในปี 1994 Feng *et al*. ได้รายงานว่าเชื้อรา *B. bassiana* สามารถเข้าทำลายแมลงได้มากกว่า 200 ชนิด เช่น แมลงพวกผีเสื้อ (Lepidoptera) แมลงพวกด้วง (Coleoptera) เพลี้ยอ่อนและตั๊กแตน เป็นต้น และนอกจากนี้ในประเทศบราซิลได้มีการทดลองนำเชื้อ *Beauveria* spp. มาควบคุมหนอนผีเสื้อ (carterpillars) ที่เข้าทำลายพืช Mate or South American holly (*Ilex paraguariensis*) ซึ่งเป็นพืชที่สำคัญมากในแอฟริกาใต้โดยพบว่า สามารถทำให้แมลงตายได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากพ่นเชื้อไปแล้ว 10 วัน

ในประเทศไทยมีรายงานการใช้เชื้อราชนิดนี้ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด เช่น

กฤษณา (2534) ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อรา *B. bassiana* ในการทำให้เกิดโรคกับหนอนไหมและหนอนกระทู้ผักพบว่า เชื้อราทำให้หนอนไหมและหนอนกระทู้ผักตายได้ถึง 54 และ 52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ในปี พ.ศ. 2541 สมบัติ และคณะ ได้ทดลองการควบคุมแมลงสิงโดยใช้เชื้อราขาว *B. bassiana* และเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* โดยพ่น spore suspension กับแมลงสิงตัวอ่อนและตัวเต็มวัยบนต้นข้าวอย่างละ 10 ตัวต่อกระถาง หลังจากการพ่นเป็นเวลา 14 วันพบว่า เชื้อรา *M. anisopliae* ปริมาณ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถควบคุมแมลงสิงตัวอ่อนและตัวเต็มวัยได้ดี ส่วนเชื้อรา *B. bassiana* ปริมาณ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถควบคุมแมลงสิงตัวเต็มวัยได้ดีเช่นกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต่อมาในปี พ.ศ. 2550 เพชรหทัย และอัจฉราพร ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการเข้าทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยจักจั่นสีเขียว โดยใช้ spore suspension ของเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *M. anisopliae* ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรในห้องปฏิบัติการพบว่า เชื้อราทั้งสองชนิดสามารถเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชทั้งสองชนิดได้ดี นอกจากนี้ยังมีรายงานในปี พ.ศ. 2551 วิวัฒน์ และคณะ ทำการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *B. bassiana* ในการเข้าทำลายหนอนและตัวเต็มวัยของแมลงดำหนามมะพร้าว *Brontispa longissima* ตัวเต็มวัยของมอดเจาะเมล็ดกาแฟ *Hypothenemus hampei* และปลวก *Coptotermes gestroi* โดยการพ่น spore suspension ของเชื้อราลงบนตัวแมลงพบว่า เชื้อราสามารถทำให้หนอนและตัวเต็มวัยของแมลงดำหนามมะพร้าวตายได้เท่ากับ 82.5 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตัวเต็มวัยของมอดเจาะเมล็ดกาแฟและปลวกตาย 77.5 และ 87.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราที่มีการใช้ประโยชน์ในระบบควบคุมทางชีวภาพ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (medium) ในการเจริญและเพิ่มปริมาณของเชื้อรา อาหารถือเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างมาก เนื่องจากเป็นแหล่งของธาตุอาหารต่างๆที่เชื้อสามารถนำไปใช้สร้างเส้นใยและสปอร์ รวมถึงสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืช โดยนิยมเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว เช่น potato dextrose broth (PDB) หรือ basal medium และอาหารแข็ง เช่น potato dextrose agar (PDA) เป็นต้น ทั้งนี้อาหารที่เหมาะสมต่อเชื้อราแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดหรือสายพันธุ์ของเชื้อรา

Fogle *et al*. (2007) ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย การสร้างสปอร์และการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อรา *C. globosum* 4 ชนิดได้แก่ oatmeal agar (OA), potato dextrose agar (PDA), corn meal agar (CMA) และ malt extract agar (MEA) จากการทดลองพบว่าเชื้อรา *C. globosum* สามารถเจริญ สร้างสปอร์และผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุดบนอาหาร OA

Karthikeyan *et al*. (2008) ศึกษาอิทธิพลของอาหารเหลว 3 ชนิดได้แก่ ground nut cake broth, coconut water broth และ potato dextrose broth ต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* พบว่า อาหาร potato dextrose broth กระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรามากที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิวัฒน์ และคณะ (2551) นำเชื้อรา *B.bassiana* ที่แยกได้จากแมลงค่อมทองมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ 5 ชนิดได้แก่ water agar (WA), potato dextrose agar (PDA), corn meal agar (CMA), sabouraud dextrose agar (SDA) และ sabouraud dextrose agar with yeast extract (SDAY) พบว่า เชื้อราสามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ PDA รองลงมาได้แก่ SDA, SDAY, CMA และ WA ตามลำดับ

2.1.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source) ถือเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากเป็นแหล่งที่ให้พลังงานแก่เชื้อราเพื่อนำไปใช้ในการเจริญและการดำรงชีวิตของเชื้อรา มีรายงานการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของเชื้อราที่มีประโยชน์ได้หลายชนิด ดังนี้

Buston and Basu (1948) ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Chaetomium globosum* และ *Memnoniella echinata* โดยทดสอบแหล่งคาร์บอน 8 ชนิด ได้แก่ glucose, maltose, cellobiose, sucrose, starch-dextrin, cello-starch, starch และ cellulose โดยเติมลงในอาหาร basal medium พบว่า เชื้อราสามารถสร้างเส้นใยได้ดีบนอาหารที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ยกเว้น cello-dextrin และ cellulose ที่เชื้อราสามารถสร้างเส้นใยได้น้อยกว่า ส่วนการสร้างสปอร์ของเชื้อราพบว่า เชื้อราสามารถสร้างสปอร์บนอาหารที่เติม cello-dextrin, cellulose และ starch ได้ดีที่สุด

Basu and Bose (1950) ทำการทดสอบแหล่งคาร์บอน 8 ชนิด ได้แก่ arabinose, glucose, fructose, sucrose, maltose, dextrin, starch และ cellulose ที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Chaetomium* พบว่า เชื้อรามีการสร้างสปอร์บนอาหารที่มีการเติม cellulose, starch และ maltose ได้มากที่สุด

Samšiňáková *et al*. (1981) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอน 6 ชนิดในอาหารเหลวที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* พบว่า เชื้อราที่เจริญในอาหารที่เติม sorbitol มีการสร้างสปอร์มากที่สุดโดยมีปริมาณ 78.0 สปอร์ต่อพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร รองลงมาได้แก่ maltose, fructose ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hegedus *et al*. (1990) ศึกษาการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ในอาหารเหลวที่มีการเติม chitin, hexosamine 2 ชนิด หรือ glucose จากการทดลองพบว่า เชื้อรามีการสร้างสปอร์ได้ดีในอาหารที่มีการเติม chitin และ N-acetyl-D-glucosamine เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลวสูตรอื่นๆ

Younis *et al*. (2004) ทดสอบอิทธิพลของแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ fructose, maltose และ sucrose ต่อการเจริญและการสร้าง acervulus ของเชื้อรา *Pestalotia psydii* ผลการทดลองพบว่า เชื้อราสามารถนำน้ำตาล fructose และ sucrose ไปใช้ในการเจริญและการสร้าง acervulus ของเชื้อราได้ดีกว่าน้ำตาล sucrose

ปี 2006 Sati and Bisht ทำการศึกษาการเจริญของเชื้อราน้ำ 4 ชนิดที่เจริญในอาหาร basal medium ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 8 ชนิด พบว่า glucose และ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราทั้งหมด และในปีเดียวกัน Sun and Liu (2006) รายงานการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอน 33 ชนิดต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราที่มีประโยชน์ในการควบคุมทางชีวภาพ 11 ชนิด พบว่า เชื้อราส่วนใหญ่เจริญได้ดีในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนประเภท monosaccharides และ disaccharides ได้แก่ D-glucose, D-mannose, sucrose และ trehalose ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อราส่วนใหญ่ที่ดีที่สุด ได้แก่ D-mannose, D-fructose และ D-xylose ขณะที่ D-glucose, sucrose, cellobiose, trehalose, chitin, dextrin, gelatin และ lactic acid สนับสนุนการสร้างสปอร์ของเชื้อราบางชนิด เช่น เชื้อรา *B. bassiana* มีการสร้างสปอร์ได้ดีที่สุดในอาหารที่มี cellobiose และ D-fructose

ต่อมาในปี 2007 Gerding-González *et al*. ศึกษาการใช้ chitin และ wheat bran เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ในชีวภัณฑ์ชนิดเม็ด พบว่า การเติม chitin และ รำข้าวสาลี (wheat bran) 2 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ได้มากขึ้นแต่หากเติม chitin มากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์จะทำให้ปริมาณสปอร์ของเชื้อราลดลง

2.1.2 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) เชื้อราที่ควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชสามารถใช้สารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญและสร้างสปอร์ได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Buston and Basu (1948) ศึกษาแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด ได้แก่ sodium nitrate, ammonium sulphate, asparagine และ casein hydrolysate ที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Chaetomium globosum* บนอาหารแข็งพบว่า เชื้อราสามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีที่สุดบนอาหารที่มีการเติม casein hydrolysate รองลงมาได้แก่ sodium nitrate และ asparagine

Basu and Bose (1950) ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Chaetomium* ในอาหาร basal medium ที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิดพบว่า peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Chaetomium* รองลงมาคือ asparagine และ sodium nitrate ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาอิทธิพลแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* พบว่า peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดโดยเชื้อราสามารถสร้างสปอร์ได้ถึง 379×10^{9} สปอร์ต่อพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร (Samšiňáková *et al*., 1981)

Campbell *et al*.(1978) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* ในอาหารเหลวที่มีการเติมกรดอะมิโน 24 ชนิดและ KNO_3 พบว่า เชื้อรามีการเจริญและการสร้างสปอร์มากที่สุดในอาหารที่เติม tryptophan และ alanine แต่ในการสร้างสปอร์ของเชื้อราพบว่าอาหารที่มีการเติม glutamine และ KNO_3

Rayati *et al*. (2001) ศึกษาความเหมาะสมของธาตุอาหารต่อการเจริญเชื้อรา *Paecilomyces fumosoroseus* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคในแมลงพบว่า แหล่งไนโตรเจน 8 ชนิด คือ $NaNO_3$, NH_4Cl, glysine, glutamine, serine, alanine, asparagine และกรดอะมิโนที่ผสมรวม 4 ชนิดแรก (glysine, glutamine, serine และ alanine) ที่เติมในอาหาร basal medium Glucose-Asparagine พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ (กรดอะมิโนแต่ละชนิดและกรดอะมิโนรวม 4 ชนิด) มีการเจริญของเชื้อราดีกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ ($NaNO_3$ และ NH_4Cl)

นอกจากสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนข้างต้นที่ทำให้เชื้อราสามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีแล้วยังมีสารอื่นด้วย คือ soytone, casitone, corn meal และ casamino acid เป็นต้น (Barnes *et al*., 1975; Pham *et al*., 2009)

2.1.3 ธาตุอาหารชนิดอื่นและวิตามิน เช่น ฟอสฟอรัส ธาตุเหล็ก ทองแดง สังกะสี และวิตามิน B-complex เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 อุณหภูมิ มีรายงานกล่าวว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราที่ควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชโดยส่วนมากอยู่ระหว่าง 25- 30 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จะลดการเจริญของเชื้อรา ซึ่งมีผลต่อการใช้ประโยชน์ในการเก็บรักษาความมีชีวิตของเชื้อรา (อนุเทพ, 2536; Santa *et al*., 2005; Ying and Feng, 2006; Pham *et al*., 2009)

2.3 ความเป็นกรดด่าง เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีสำคัญต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของเชื้อรา เนื่องจากบริเวณที่มีการอาศัยของเชื้อราแต่ละชนิดในธรรมชาติอาจมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมือนหรือแตกต่างกันได้ ดังนั้นการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดเพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงหรือการเก็บรักษาเชื้อจึงมีความสำคัญเช่นกัน

Samšiňáková *et al*. (1981) ศึกษาความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 4.1, 4.4, 5.0 และ 5.6 ในอาหารเหลวต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B.bassiana* หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน พบว่า ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 5.0 มีการสร้างสปอร์มากที่สุด คือ 17.5×10^{9} สปอร์ต่อพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร ขณะที่ Karthikeyan (2008) รายงานว่า เชื้อรา *B.bassiana* สามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีในอาหารเหลว PDB ที่ระดับ pH 6-8

งานวิจัยในประเทศไทยมีรายงานว่า ในปี พ.ศ. 2534 กฤษณา ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* เพื่อดูการเจริญและการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 7 ชนิด ระดับ pH 4 ระดับ พบว่าอาหาร PDA ระดับ pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อมากที่สุด โดยจะเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ (9 ซม.) ในเวลาประมาณ 20 วัน และสร้างสปอร์ได้ $3,226\times10^{4}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ต่อมา อนุเทพ (2536) รายงานว่า pH เริ่มต้นของอาหารที่ระดับ 3.5 มีความเหมาะสมที่สุดต่อการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* และเชื้อรา *C.globosum* มีค่าความเหมาะสมที่ระดับ pH 5-7 โดยสภาพที่เป็นกรดจะสนับสนุนการสร้างสปอร์และสภาพเป็นกลางจะสนับสนุนการสร้างเส้นใย ส่วนเชื้อรา *B.bassiana* มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเจริญและสร้างสปอร์ที่ระดับ pH 5-6 (Fogle, 2008; Santa, 2004; Ying and Feng , 2006 ; Pham *et al*., 2009)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในปี พ.ศ. 2540 สุมินตรา ทำการทดสอบการเพาะเชื้อราที่สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ พบว่า *C.cupreum* และ *C.globosum* มีการเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร PDA ที่ระดับ pH 5-6 อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ส่วน *T. harzianum* PC01และ *T. hamatum* PC02 พบว่ามีการเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร PDA ที่ระดับ pH 4-5 อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส

2.4 ความชื้น มีความสำคัญต่อการงอกและการเจริญของเส้นใย ดังเช่น การศึกษาอิทธิพลของความชื้น 5 ระดับ ได้แก่ 60, 63, 75, 85 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria* spp. พบว่า เชื้อราสามารถเจริญเติบโตเมื่อมีความชื้น 60, 63, 75 และ 85 เปอร์เซ็นต์ แต่จะมีการเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีที่สุดเมื่อมีความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความชื้น 91 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เชื้อรา *Beauveria* บางชนิดไม่เจริญเติบโต (Padmini and Padmaja, 2010)

2.5 ก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ในปี 2004 Santa *et al*. รายงานว่าการเติมอากาศในถังหมัก (bioreactor) ปริมาณ 60 มิลลิลิตรต่อนาที หลังจากปลูกเชื้อรา *Beauveria* แล้ว 10 วัน สามารถผลิตสปอร์ได้มากที่สุด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จำเป็นต่อการงอกและการเจริญของสปอร์ของเชื้อรา *C. globosum* และยังมีผลต่อการสร้าง perithecium อีกด้วย (Buston *et al*., 1966)

2.6 ความชื้นที่มีผลต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์ (water activity; a_w) เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการน้ำที่ใช้ประโยชน์ได้ (available water) ต่างกัน ส่วนใหญ่ต้องการน้ำในปริมาณสูง แต่บางชนิดมีการเจริญได้ที่ a_w ต่ำทำให้สามารถเจริญได้ดีบนอาหารที่มีน้ำตาลหรือเกลือสูง มีรายงานการศึกษาค่า a_w ระหว่าง 0.998-0.88 ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราทำลายแมลง 3 ชนิด ได้แก่ *B. bassiana*, *M. anisoliae* และ *P. farinosus* พบว่า เชื้อราทั้งสามชนิดเจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่มีค่า a_w อยู่ระหว่าง 0.90-0.998 (Hallsworth and Magan, 1999)

2.7 แสง เชื้อราส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในที่มีแสง แต่มีบางชนิดที่สามารถสร้างสปอร์ได้ดีภายใต้แสง near vltraviolet (near UV)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การเพิ่มปริมาณเชื้อราที่มีการใช้ประโยชน์ในระบบควบคุมทางชีวภาพ

การนำเชื้อราที่มีประโยชน์ไปใช้ควบคุมโรคและแมลงนั้นจำเป็นจะต้องใช้เชื้อปริมาณมาก เนื่องจากมีผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุม โดยมีวิธีการเพิ่มปริมาณเชื้อ 2 แบบ ดังนี้

3.1 การเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว วิธีนี้สามารถเพิ่มปริมาณของเชื้อราได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะเส้นใยเชื้อรา มีการสร้างสปอร์แบบ blastospore เหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้ทางการค้าหรือระบบอุตสาหกรรมได้ดี ข้อเสียคือจะมีการสร้าง aerial conidia ได้เล็กน้อยเนื่องจากการสร้างสปอร์ชนิดนี้ต้องให้เชื้อราสัมผัสกับอากาศ นอกจากนี้การเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวนั้นมีโอกาสปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นมากกว่าการเลี้ยงบนอาหารแข็ง

3.2 การเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็ง วิธีนี้สามารถเพิ่มปริมาณสปอร์ของเชื้อราได้จำนวนมาก เนื่องจากเชื้อราจะเจริญบนผิวหน้าของวัสดุเพาะเลี้ยงทำให้มีพื้นที่สัมผัสกับอากาศมากกว่าอาหารเหลว หากเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นสามารถเห็นได้ง่ายกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว นอกจากนี้ยังสามารถนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรือธัญพืชต่างๆที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายในแต่ละท้องถิ่นมาใช้ในการเพาะเลี้ยงได้อีกด้วย ดังรายงานการวิจัยของ Sahayaraj and Namasivayam (2008) ที่ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อราทำลายแมลง 3 ชนิด ได้แก่ *B. bassiana*, *P. fumosoroseus* และ *Verticillium lecanii* ในวัสดุธรรมชาติ เช่น เมล็ดธัญพืช 6 ชนิด ได้แก่ ข้าว ข้าวสาลี ข้าวฟ่างไข่มุก ข้าวฟ่างพันธุ์ ragi และข้าวโพด พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* สามารถสร้างสปอร์ได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนข้าวสาลี ขณะที่ข้าวฟ่างสนับสนุนการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. fumosoroseus* และ *V. lecanii* ได้ดีที่สุด

จิระเดช และวรรณวิไล (2542) กล่าวว่าในกรณีที่ต้องการสปอร์ของเชื้อราไตรโคเดอร์มาจำนวนมากให้ใช้วิธีเพิ่มปริมาณเชื้อบนเมล็ดข้าวฟ่าง โดยบรรจุข้าวฟ่างต้มสุกลงในถุงพลาสติกทนความร้อน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ทิ้งให้เย็นแล้วนำ spore suspension ของเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหาร PDA มาปลูกเชื้อทิ้งไว้ 5-7 วัน ใช้น้ำสะอาด 1 ลิตรต่อเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่าง 3 ถุง มาล้างสปอร์แล้วกรองน้ำ spore suspension ของเชื้อนำไปใช้ทันทีหรือเก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำไปใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิวัฒน์ และคณะ (2554) ทำการเพิ่มปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ในเมล็ดธัญพืช 4 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวเสาไห้และปลายข้าวกล้อง ในระยะเวลา 28 วัน พบว่า เชื้อราสร้างสปอร์บนปลายข้าวกล้องมากที่สุดเท่ากับ 4.13×10^{9} สปอร์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ข้าวเสาไห้ ข้าวโพดและข้าวฟ่าง ตามลำดับ แม้ว่าวิธีนี้จะสามารถเพิ่มปริมาณสปอร์ของเชื้อราได้ในปริมาณมาก แต่ข้อเสียคือต้องใช้แรงงานและพื้นที่ในการผลิตจำนวนมากกว่าในอาหารเหลว อย่างไรก็ตาม สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนได้ง่ายกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวและไม่ต้องใช้อุปกรณ์ในการเลี้ยงเชื้อมาก

4. การเก็บรักษาเชื้อราในรูปแบบหัวเชื้อหรือชีวภัณฑ์

การเก็บรักษาเชื้อราในรูปแบบนี้จะช่วยให้สะดวกต่อการนำไปใช้ในการควบคุมโรคและแมลงมากขึ้น โดยในการผลิตจะต้องคำนึงถึงการรักษาความมีชีวิตและคงคุณสมบัติของเชื้อราดังกล่าวไว้ได้ รูปแบบการนำไปใช้งานและต้นทุนการผลิตโดยรูปแบบของชีวภัณฑ์สามารถแบ่งออกได้ 2 ชนิด คือ ชนิดแห้ง (dry products) และชนิดเหลว (liquid suspensions)

4.1 รูปแบบชนิดแห้ง

4.1.1 ชนิดผงฝุ่น (dust) ขนาดอนุภาค 5-20 มิลลิเมตร มีปริมาณเชื้อน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนัก โดยปกติเตรียมจากการเติมเชื้อผสมกับสารพาที่เป็นแร่เช่น clay, talcum ในเครื่องปั่นหรือเครื่องผสม อาจมีการเติมสารดูดความชื้นเพื่อป้องกันการจับตัวของสาร ขนาดของอนุภาค ความหนาแน่นและความสามารถในการเคลื่อนที่มีความสำคัญเนื่องจากส่งผลต่อการนำไปใช้ โดยอนุภาคของผงฝุ่นจะเคลื่อนที่ไปในอากาศแล้วแทรกซึมไปปกคลุมพืชหรือสัมผัสกับเชื้อโรคหรือแมลงเป้าหมาย

4.1.2 ชนิดเม็ด (granules, pellets, capsules and briquettes) ความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ประมาณ 5-20 เปอร์เซ็นต์ โดยปกติจะใช้มากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ ชีวภัณฑ์ชนิดนี้เชื้อจะจับอยู่กับสารพา เช่น แร่ clay, starch polymers, dry fertilizers และ วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร การเลือกชนิดของสารพาขึ้นอยู่กับการดูดซับ ความแข็ง ความหนาแน่นและอัตราการสลายตัวของสารในน้ำ รูปแบบของชีวภัณฑ์ คือ เชื้อเกาะอยู่ที่ผิวภายนอกของเม็ดโดยมีการเคลือบหรือไม่เคลือบสารจับติดเชื้ออยู่ร่วมกับสารพาที่มีลักษณะเป็นแป้งเปียก สารที่ใช้เคลือบนั้นมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับอัตราการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ควบคุม การปล่อยเชื้อและขนาด การใช้คือนำเม็ดเชื้อไปหว่านลงดินหรือละลายน้ำแล้วฉีดพ่น ชีวภัณฑ์ชนิดนี้ไม่เป็นอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจและสามารถชั่งปริมาณการใช้ได้ง่ายและแน่นอนกว่าแบบผงฝุ่น

4.1.3 ชนิดผงเปียกน้ำ (wettable powders) การผลิตชีวภัณฑ์ชนิดนี้เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 50-80 เปอร์เซ็นต์ สารเติม (filler) 15-45 เปอร์เซ็นต์ สารที่ทำให้กระจายตัว (dispersant) 1-10 เปอร์เซ็นต์ และสารลดแรงตึงผิว 3-5 เปอร์เซ็นต์ สารเติมควรเป็นสารที่ไม่มีผลต่อเชื้อราปฏิปักษ์และสามารถละลายน้ำได้ดี รูปแบบการใช้คือผสมน้ำแล้วฉีดพ่น ชุบ แช่หรือทา ส่วนของพืชที่ต้องการป้องกันหรือควบคุมโรคและแมลง

4.2 รูปแบบชนิดเหลว

4.2.1 ชนิดสารแขวนลอย [suspension (flowable) concentrates] องค์ประกอบของชีวภัณฑ์ชนิดนี้คือ ปริมาณเชื้อ 10-40 เปอร์เซ็นต์ สารแขวนลอย (suspender) 1-3 เปอร์เซ็นต์ สารที่ทำให้กระจายตัว 1-5 เปอร์เซ็นต์ สารลดแรงตึงผิว 3-8 เปอร์เซ็นต์ สารพาที่เป็นของเหลว (carrier liquid) คือ น้ำหรือน้ำมัน 35-65 เปอร์เซ็นต์ รูปแบบชีวภัณฑ์ชนิดนี้พบว่า อนุภาคของเชื้อจะแพร่กระจายอยู่ในสารแขวนลอย โดยการเติมสารแขวนลอย ในที่นี้จะทำให้ของเหลวมีลักษณะคล้ายกาวเหนียว เช่น polysaccharide gums, cellulose หรือ systhetic polymers สารที่ทำให้กระจายตัวจะช่วยลดการตกตะกอน สารลดแรงตึงผิวจะทำหน้าที่เป็น emulsifiers รูปแบบการนำไปใช้คือผสมน้ำแล้วฉีดพ่น ชุบ แช่หรือทา ส่วนของพืชที่ต้องการป้องกันหรือควบคุมโรคและแมลง

4.2.2 ชนิด emulsion สามารถลดการตกตะกอนของเชื้อได้ระหว่างเก็บรักษาและระหว่างการใช้งาน ชีวภัณฑ์รูปแบบนี้มีความหนืดสูงและมีการระเหยของน้ำน้อยมาก เหมาะกับการนำไปพ่นบนผิวใบพืช (Burges, 1998)

ตัวอย่างรายงานการศึกษากรรมวิธีการผลิตชีวภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ มีดังนี้

Daoust *et al*. (1983) ศึกษาอิทธิพลของสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบน้ำมัน 14 สูตร และรูปแบบแห้ง 16 สูตร แบ่งเป็นชนิดเม็ด 4 สูตรและชนิดผงแห้ง 12 สูตรต่อความมีชีวิตของสปอร์เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* จากผลการทดลองพบว่า หลังการเก็บเชื้อราในชีวภัณฑ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รูปแบบน้ำมันเป็นเวลา 2 เดือนที่อุณหภูมิ 19 และ 26 องศาเซลเซียส สปอร์ของเชื้อราส่วนใหญ่สูญเสียความมีชีวิตอย่างรวดเร็ว ขณะที่ชีวภัณฑ์ในรูปแบบแห้งสามารถรักษาความมีชีวิตของสปอร์เชื้อราได้มากกว่า โดยการเก็บเชื้อราที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถรักษาความมีชีวิตของสปอร์เชื้อราได้นานเกิน 1 ปี แต่หากเก็บที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสความมีชีวิตของสปอร์เชื้อราจะลดลงต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยชีวภัณฑ์ชนิดผงแห้งส่วนใหญ่มีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษาสปอร์ของเชื้อรามากกว่าชีวภัณฑ์ชนิดเกร็ด และหากมีการเติมสารดูดความชื้นในชีวภัณฑ์ชนิดผงแห้งจะช่วยรักษาความมีชีวิตของสปอร์เชื้อรามากขึ้น

Vidhyasekaran and Muthamilan (1995) ศึกษาการพัฒนาสารชีวภัณฑ์ชนิดผงแห้งของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* ในการควบคุมโรคเหี่ยวจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* โดยมีสารพาที่ใช้ทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ talc, vermiculite, kaolinite, lignite, peat และ farmyard manure พบว่า สารชีวภัณฑ์ที่มี talc และ peat เป็นส่วนประกอบสามารถเก็บรักษาความมีชีวิตของเชื้อ *P. fluorescens* ได้นานถึง 240 วัน แม้ว่าจะเริ่มมีการตายหลังจากการเก็บรักษาเชื้อเป็นเวลา 30 วัน

Connick *et al*.(1998) ศึกษาการเตรียมชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* เพื่อใช้ควบคุม narcotic plants ซึ่งประกอบด้วย semolina, kaolin, *F. oxysporum* dried biomass และ deionized water พบว่า สามารถเก็บรักษาความมีชีวิตของ chlamydospores เชื้อราได้อย่างน้อยที่สุด 1 ปีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีค่า a_w เท่ากับ 0.12 ความชื้นประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ และหากเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสสามารถเก็บรักษา chlamydospores ของเชื้อราได้อย่างน้อย 2 ปี ส่วนการเก็บรักษา microconidia ของเชื้อรา *F. oxysporum* ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส มีค่า a_w เท่ากับ 0.33 สามารถเก็บรักษาความมีชีวิตของสปอร์เชื้อราได้ประมาณ 10 เดือน

Sandoval-Coronado *et al*. (2001) ศึกษาการผลิตชีวภัณฑ์ชนิดผงแห้งจาก blastospore ของเชื้อรา *Paecilomyces fumosoroseus* โดยทดสอบสารพา 6 ชนิด ได้แก่ corn starch, rice flour, talc, mexican lime, calcined kaolin clay และ diatomaceous earth ผลการทดลองพบว่าการใช้ calcined kaolin clay เป็นสารพาในการผลิตชีวภัณฑ์ชนิดผงแห้งสามารถเก็บรักษาความมีชีวิตของ blastospore ของเชื้อราได้ดีที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Patiño-Vera *et al*. (2005) ศึกษาการเก็บรักษาความมีชีวิตของชีวภัณฑ์ชนิดเหลวของยีสต์ *Rhodotorula minuta* ที่ใช้ควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง โดยผลิตจาก glycerol ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์หรือ xanthan gum 1, 2, 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตรและการใช้ glycerol 20 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ xanthan gum 5 กรัมต่อลิตร พบว่า การเติม glycerol 20 เปอร์เซ็นต์และ xanthan gum 5 กรัมต่อลิตร สามารถเก็บรักษาความมีชีวิตของยีสต์ได้ถึง 10^7 CFU/ml จากเชื้อเริ่มต้น 10^9 CFU/ml หลังจากเก็บรักษานาน 6 เดือนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Bhat *et al*. (2009) การเก็บรักษาเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในชีวภัณฑ์ชนิดผงแห้งซึ่งมีการใช้ talc เป็นสารพาพบว่า ชีวภัณฑ์นี้สามารถเก็บรักษาความมีชีวิตของเชื้อราได้ถึง 180 วัน ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและในปีเดียวกัน Sathiyaseelan *et al*. (2009) ได้ศึกษาการผลิตชีวภัณฑ์แบบน้ำมันของเชื้อรา *T. viride* โดยใช้สารพา 5 สูตร ได้แก่ paraffin oil, soya bean oil, การผสม paraffin oil กับ soya oil, การผสม paraffin oil กับ glycerol และ soya oil กับ glycerol ในการเก็บรักษาเป็นเวลา 49 วันพบว่า paraffin oil สามารถรักษาความมีชีวิตของเชื้อราได้ดีที่สุด

Haggag and Singer (2012) ศึกษาการพัฒนาชีวภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดในการควบคุมโรคผลเน่าของสตอเบอรี่พบว่า ชีวภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของ talc, kaolin และ glycerol สามารถรักษาความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียได้นาน 60 วัน

ในประเทศไทยมีรายงานเกี่ยวกับการผลิตชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *Trichoderma* รูปแบบผงแห้งเชิงการค้า และการผลิตหัวเชื้อราบริสุทธิ์ชนิดผงแห้งเพื่อใช้ผลิตเป็นเชื้อสด ซึ่งสามารถเก็บรักษาไว้ในสภาพห้องปฏิบัติการไม่น้อยกว่า 6 เดือน และเก็บรักษาได้มากกว่า 1 ปี ในตู้เย็น (8-10 องศา-เซลเซียส) การผลิตชีวภัณฑ์แบบผงแห้งนั้นทำได้โดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* บนวัสดุอาหารแข็งประกอบด้วย เมล็ดธัญพืช เมล็ดข้าวฟ่าง เมล็ดข้าวโพด หรือรำข้าว นำไปผสมกับสารพาบางชนิด เช่น diatomite, kaolin, หรือ talcum จากนั้นนำไปตากแห้งแล้วบดเป็นผง สำหรับการผลิตในรูปแบบเม็ดทรงกลมมีรายงานการศึกษาวิจัยแต่ไม่ได้ผลิตเป็นการค้า เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูง (จิระเดช, 2549) นอกจากนี้ยังมีการผลิตชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *Chaetomium* ในรูปแบบเม็ดทรงกลม (pellets) โดยการนำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Chaetomium* ผสมกับ 10 เปอร์เซ็นต์ sodium alginate แล้วนำไปหยดลงในสารละลาย Ca gluconate 0.1M หรือ $CaCl_2$ 0.25M ผึ่งให้แห้งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อที่หยดลงใน $CaCl_2$ มีมากกว่าใน Ca gluconate (เกษม, 2535) ส่วนชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *Beauveria* ใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประเทศไทยนั้นมีในรูปแบบผงแห้งของบริษัท แอพพลายเค็มแต่ยังไม่พบงานวิจัยในการผลิตเป็นหัวเชื้อที่ใช้ผลิตเป็นเชื้อสดหรือชีวภัณฑ์รูปแบบอื่นๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อรา *Chaetomium globosum* ได้รับจาก ผศ.ดร. รัติยา พงศ์พิสุทธา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชหลายชนิด

ส่วนเชื้อรา *Beauveria bassiana* (001) ได้รับจากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงหลายชนิด

การเตรียมเชื้อราและตรวจนับสปอร์ของเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อรา *Chaetomium globosum* และเชื้อรา *Beauveria bassiana* บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง near UV และ cool white fluorescent นาน 10-14 วัน ใช้ cork borer ขนาด 0.6 มิลลิเมตร เจาะขอบโคโลนีของเชื้อราเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการเจริญและการสร้างสปอร์ สำหรับการตรวจนับความเข้มข้นสปอร์ให้ใช้น้ำที่ผสม 0.05% tween 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซสเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ปริมาตร 15 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นขูดสปอร์ของเชื้อรา มาตรวจนับสปอร์ด้วย haemacytometer

1. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราที่มีการใช้ประโยชน์ในระบบควบคุมทางชีวภาพ

1.1 ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum*

เตรียมสูตรอาหารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ PDA, potato carrot agar (PCA), PDA ผสมผงไคโตซาน 1 กรัมต่อลิตร (PDAC1), PDA ผสมไคโตซานปูแดง 2 มิลลิลิตรต่อลิตร (PDAC2) และ yeast extract peptone agar (YPA) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ วางเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

C. globosum ที่เตรียมไว้มาวางลงบนอาหารแต่ละชนิด จำนวน 4 ซ้ำต่ออาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน บันทึกผลการทดลองโดยการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อรา

1.2 ศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum*

เตรียมอาหาร PDA เป็นอาหารพื้นฐาน ทำการปรับค่า pH ให้ได้ที่ระดับ 5.5, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 โดยใช้ 1M NaOH และ 1N HCl นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อ แบ่งอาหารใส่จานเลี้ยงเชื้อ และวางเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ที่เตรียมไว้ลงบนอาหาร PDA ที่มีค่า pH ระดับต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำต่อระดับ pH บันทึกผลการทดลองโดยการตรวจวัดขนาดโคโลนีของเชื้อรา

1.3 ศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum*

1.3.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เตรียมอาหาร basal medium 1 ซึ่งดัดแปลงจาก Basu and Bose (1950) ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย $NaNO_3$ 2 กรัม, K_2HPO_4 1 กรัม, KCl 0.5 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม, $FeSO_4$ 0.01 กรัม และวุ้น 10 กรัม เป็นพื้นฐาน ทำการผสมด้วยสารที่เป็นคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่างๆ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อรา สำหรับเชื้อรา *B. bassiana* ใช้ cellobiose, glucose, fructose และ trehalose ปริมาณ 19, 20, 20 และ 19 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อรา *C. globosum* เติมแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ cellulose, glucose และ maltose ปริมาณ 10, 30 และ 30 กรัมต่อลิตรในอาหาร โดยมี basal medium 1 เป็นการทดลองควบคุม นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อ แบ่งอาหารใส่จานเลี้ยงเชื้อ และวางเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ที่เตรียมไว้ลงบนอาหารแต่ละชนิด จำนวน 4 ซ้ำต่ออาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำต่ออาหาร บันทึกผลการทดลองโดยการตรวจวัดขนาดโคโลนีของเชื้อรา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เตรียมอาหาร basal medium 2 ปริมาตรอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย glucose 10 กรัม KH_2PO_4 1 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม $FeCL_3$ 1.447 มิลลิกรัม $ZnSO_4$ 0.880 มิลลิกรัม $MnSO_4$ 0.406 มิลลิกรัม และวุ้น 10 กรัม เป็นพื้นฐาน ทำการผสมด้วยสารที่เป็นตัวแทนของไนโตรเจน เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสูตรอาหารต่อการเจริญของเชื้อรา สำหรับเชื้อรา *B. bassiana* ใช้ arginine, tryptophan, phenylalanine และ KNO_3 ปริมาณ 1.3, 3.1, 5.0 และ 3.0 กรัม โดยมี basal medium 2 เป็นกรรมวิธีควบคุม

ส่วนเชื้อรา *C. globosum* ใช้อาหาร basal medium 3 ที่ได้จากการดัดแปลงของ Basu and Bose (1950) แต่มีการเติม glucose 5 กรัม จากนั้นเติมแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ asparagine, glutamine, $NaNO_3$ และ peptone ปริมาณอย่างละ 2 กรัมลงในอาหาร โดยมี basal medium 3 เป็นกรรมวิธีควบคุม เมื่อผสมอาหารแต่ละชนิดเรียบร้อยแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปทดสอบการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำต่ออาหาร วัดขนาดโคโลนีของเชื้อรา สำหรับเชื้อรา *B. bassiana* ให้ทำการนับสปอร์ของเชื้อราในวันที่ 14 จากชิ้นวุ้นขนาด 0.6 เซนติเมตรต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร โดยใช้ haemacytometer

1.4 ทดสอบสูตรอาหารซึ่งพัฒนาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum*

เตรียมสูตรอาหารที่ใช้สำหรับทดสอบเชื้อรา *B. bassiana* ได้แก่ PDA, potato fructose agar (PFA), PFA ที่เติม KNO_3 3 กรัมต่อลิตร, basal medium 1 ที่เติม KNO_3 3 กรัมต่อลิตร, basal medium 1 ที่เติม KNO_3 และ fructose 3 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ , basal medium 2 ที่เติม fructose 20 กรัมต่อลิตร, basal medium 2 ที่เติม KNO_3 และ fructose 3 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ส่วนสูตรอาหารที่ใช้ทดสอบสำหรับเชื้อรา *C. globosum* ได้แก่ PDA, PDA ที่เติม chitosan 2 มิลลิลิตร, potato cellulose agar (PCA) ที่เติม chitosan 2 มิลลิลิตร, PCA ที่เติม chitosan 2 มิลลิลิตรและ asparagine 2 กรัม, basal medium 3 ที่เติม asparagine 2 กรัม, basal medium3 ที่เติม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

cellulose 10 กรัม, basal medium3 ที่เติม asparagine และ cellulose ปริมาณ 2 และ 10 กรัม ตามลำดับ เมื่อผสมอาหารแต่ละชนิดเรียบร้อยแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปทดสอบการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำต่ออาหาร บันทึกผลการทดลองโดยการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อรา และทำการนับสปอร์ของเชื้อราในวันที่ 14 โดยใช้ haemacytometer

1.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในการเจริญของเชื้อราบนอาหารแต่ละชนิด โดยนำข้อมูลที่ได้จากแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R stat version 2.13.1 ทำการวิเคราะห์ Least significant difference (LSD) เพื่อหาความแตกต่างทางสถิติ

2. ทดสอบการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* บนวัสดุธรรมชาติ

2.1 การคัดเลือกวัสดุธรรมชาติที่เหมาะสม

เตรียมธัญพืช 3 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ปลายข้าว ข้าวเปลือก ข้าวโพดบด ดังนี้ ปลายข้าวเตรียมโดยหุงข้าวในอัตราข้าว 3 ส่วนต่อน้ำ 1 ส่วน โดยใช้หม้อหุงข้าวไฟฟ้า ตามวิธีของจิระเดช (2549) ข้าวเปลือกเตรียมโดยการต้มจนเมล็ดข้าวเริ่มปริแตกและข้าวโพดบดเตรียมโดยการต้มน้ำจนเมล็ดกึ่งสุกกึ่งดิบจากนั้นสะเด็ดน้ำและผึ่งเมล็ดข้าวเปลือกและข้าวโพดบดจนแห้ง

ชั่งธัญพืชแต่ละชนิดๆละ 100 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกทนความร้อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทิ้งให้เย็นแล้วจึงทำการปลูกเชื้อราทั้ง 2 ชนิด โดยตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10-14 วันจำนวน 3 ชิ้นต่อถุง จากนั้นนำไปเลี้ยงภายใต้แสง cool white fluorescent ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปริมาณของเชื้อราทุกๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยชั่งตัวอย่างเชื้อราที่เจริญบนธัญพืชแต่ละชนิดๆละ 5 กรัม ใส่ลงในน้ำที่ผสม 0.05% tween 80 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางโดยทำ serial dilution แล้วจึงทำการ spread plate บนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 ศึกษาผลของการเพิ่มแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในวัสดุธรรมชาติในการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา

นำวัสดุธรรมชาติที่คัดเลือกจากข้อ 2.1 คือ ข้าวโพดบด แล้วนำเตรียมด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน จากนั้นชั่งใส่ถุงพลาสติกทนความร้อนปริมาณ 100 กรัมต่อถุง แล้วเตรียมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับเชื้อราแต่ละชนิดดังนี้

สำหรับเชื้อรา *B. bassiana* เติม fructose 0.2 กรัม และ KNO_3 0.03 กรัม ส่วนเชื้อรา *C. globosum* เติม cellulose 0.1 กรัม และ chitosan 20 ไมโครลิตร นำสารดังกล่าวมาละลายในน้ำ 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมลงในถุงข้าวโพดบดที่เตรียมไว้ โดยเปรียบเทียบกับถุงข้าวโพดบดที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทิ้งให้เย็นแล้วจึงทำการปลูกเชื้อราทั้ง 2 ชนิด โดยตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10-14 วันจำนวน 3 ชิ้นต่อถุง แล้วนำไปเลี้ยงภายใต้แสง cool white fluorescent ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปริมาณของเชื้อราทุกๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยชั่งตัวอย่างเชื้อราที่เจริญบนข้าวโพดบดแต่ละชนิดๆละ 5 กรัม ใส่ลงในน้ำที่ผสม 0.05% tween 80 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางโดยทำ serial dilution แล้วจึงทำการ spread plate บนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

บันทึกข้อมูลโดย ตรวจนับโคโลนีเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ที่เจริญบนอาหาร นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R stat version 2.13.1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลปริมาณเชื้อราที่เจริญบนธัญพืชแต่ละชนิด ทำการวิเคราะห์ Least significant difference (LSD) เพื่อหาความแตกต่างทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การเก็บรักษาเชื้อราที่มีการใช้ประโยชน์ในระบบควบคุมทางชีวภาพในรูปแบบหัวเชื้อหรือชีวภัณฑ์

การเตรียมเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* เพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อหรือชีวภัณฑ์

เลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ในเมล็ดข้าวโพดบดเป็นเวลา 14-21 วันโดยทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3 จากนั้นนำไปปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นอเนกประสงค์ยี่ห้อ sharp รุ่น ice นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.1 การศึกษาวิธีการผลิตชีวภัณฑ์เชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ในรูปแบบของเหลว

เตรียมสารพาที่ใช้ในการทดลองดังนี้ สารที่ทำให้กระจายตัว คือ แร่ 3 ชนิด ได้แก่ talc, green cal และ pumice สารแขวนลอย คือ xanthan gum และ sodium aluminium silicate สารลดแรงตึงผิว คือ 0.05% tween 80 และสารพาที่เป็นของเหลว คือ น้ำ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที แล้วนำเชื้อราที่เตรียมไว้ ปริมาณ 14 กรัม มาผสมกับสารพาตามอัตราส่วนในแต่ละสูตรตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารพาที่ใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์รูปแบบของเหลวสูตรต่างๆ

ส่วนประกอบในรูปแบบของเหลว	สูตรชีวภัณฑ์เชื้อรารูปแบบของเหลว			
	1	2	3	4
Talc (กรัม)	50.00	-	-	-
Pumice (กรัม)	-	50.00	-	-
Greencal (กรัม)	-	-	50.00	-
Sodium aluminium silicate (กรัม)	0.25	0.25	0.25	0.25
Xanthan gum (กรัม)	0.30	0.30	0.30	0.30
0.1% Tween 80 (มิลลิลิตร)	10.00	10.00	10.00	10.00
น้ำ (มิลลิลิตร)	90.00	90.00	90.00	90.00

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้บรรจุลงขวดแก้วแล้วใส่ลงในกล่องทึบแสง ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปริมาณเชื้อราโดยดูดชีวภัณฑ์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำที่ผสม 0.05% tween 80 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางโดยทำ serial dilution แล้วจึงทำการ spread plate บนอาหาร PDA บันทึกผลโดยการตรวจนับโคโลนีเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ที่เจริญบนอาหาร

3.2 การศึกษาวิธีการผลิตชีวภัณฑ์เชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ในรูปแบบผงแห้ง

เตรียมสารพา ได้แก่ แร่ 3 ชนิด คือ talc, green cal และ pumice สารจับติด 2 ชนิด carboxymethyl cellulose (CMC) และ glycerol จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที ชั่งสารพาตามอัตราส่วนในแต่ละสูตรตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารพาที่ใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งตามสูตรต่างๆ

ผงแห้งสูตรที่	ส่วนประกอบสำหรับรูปแบบผงแห้ง				
	Talc (กรัม)	Pumice (กรัม)	Greencal (กรัม)	CMC (กรัม)	Glycerol (มิลลิลิตร)
1	60.00	-	-	-	-
2	60.00	-	-	5.00	-
3	60.00	-	-	-	5.00
4	-	60.00	-	-	-
5	-	60.00	-	5.00	-
6	-	60.00	-	-	5.00
7	-	-	60.00	-	-
8	-	-	60.00	5.00	-
9	-	-	60.00	-	5.00

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใส่เชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ที่เตรียมไว้ ในแต่ละสูตรปริมาณอย่างละ 20 กรัม แล้วปั่นผสมกับสารพาตามสูตรต่างๆ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้บรรจุลงในกล่องพลาสติก แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปศึกษาในการทดลองต่อไป

3.2.1 การศึกษาคุณสมบัติการแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* รูปแบบผงแห้ง

ชั่งตัวอย่างชีวภัณฑ์เชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ปริมาณสูตรละ 1.5 กรัม ใส่ลงในน้ำปริมาตร 60 มิลลิลิตร ไม่ต้องเขย่า จากนั้นสังเกตการแตกตัวของผงเชื้อราในน้ำภายในระยะเวลา 5 นาที บันทึกภาพและสังเกตการแตกตัว

3.2.2 การศึกษาความมีชีวิตของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้ง

ชั่งตัวอย่างชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ที่มีอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 9, 20, 40, 60, 90 และ 180 วัน ปริมาณสูตรละ 5 กรัม ใส่ลงในน้ำที่ผสม 0.05% tween 80 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางโดยทำ serial dilution แล้วจึงทำการ spread plate บนอาหาร PDA บันทึกผลโดยการตรวจนับโคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ที่เจริญบนอาหาร

3.3 การศึกษาวิธีการผลิตชีวภัณฑ์เชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ในรูปแบบเม็ด

3.3.1 การศึกษาชนิดของสารจับติด (binder) ที่เหมาะสมในการผลิตชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ด

ชั่งเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ที่เตรียมไว้ปริมาณสูตรละ 5 กรัมผสมกับแร่ talc ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาณสูตรละ 15 กรัม ปั่นให้เข้ากัน จากนั้นผสมกับสารจับติด 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชนิด ได้แก่ polyvinyl pyrrolidone K30 (PVP K30), xanthan gum, chitosan และ glycerol ชั่งตามอัตราส่วนในแต่ละสูตรตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนผสมของชีวภัณฑ์เชื้อรารูปแบบเม็ดที่ใช้ในการคัดเลือกชนิดของสารจับติด

ส่วนประกอบสำหรับรูปแบบเม็ด	สูตรชีวภัณฑ์เชื้อรารูปแบบเม็ด				
	1	1+	2	3	4
หัวเชื้อราสด (กรัม)	5.00	10.00	5.00	5.00	5.00
Talc (กรัม)	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
PVP K30 (กรัม)	0.40	0.40	-	-	-
Xanthan gum (กรัม)	-	-	0.45	-	-
Chitosan (มิลลิลิตร)	-	-	-	5.00	-
Glycerol (มิลลิลิตร)	-	-	-	-	4.00
น้ำ (มิลลิลิตร)	4.00	4.00	5.00	-	-

นำมาตอกเป็นเม็ดให้มีน้ำหนักเม็ดละประมาณ 1.5 กรัม โดยนำส่วนผสมที่ได้ในแต่ละสูตรใส่ลงในท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร ตอกให้เป็นท่อนกลมแล้วตัดเป็นเม็ดด้วยมีดจะได้ชีวภัณฑ์เชื้อราที่มีลักษณะกลมแบน แล้วนำไปชั่งให้ได้น้ำหนักตามปริมาณที่ต้องการ จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกชนิดของสารจับติดที่เหมาะสมจากคุณสมบัติการแตกกระจายตัวของเม็ดยาในน้ำภายในระยะเวลา 5 นาที โดยใช้ชีวภัณฑ์เชื้อราจำนวน 1 เม็ดต่อน้ำปริมาตร 60 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 4 ซ้ำต่อสูตร บันทึกผล

3.3.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารจับติดต่อการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* โดยวิธี poisoned food

นำเม็ดชีวภัณฑ์เชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* สูตรที่ 1 และ 3 ซึ่งมีส่วนผสมของสารจับติดที่ผ่านการคัดเลือก 2 ชนิด คือ polyvinyl pyrrolidone K30 (PVP K30) และ chitosan ตามลำดับ อย่างละ 1 เม็ด ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ WA ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เขย่าจนเม็ดชีวภัณฑ์เชื้อราแตกกระจายตัวจนหมด ในกรรมวิธีควบคุมจะไม่ผสมเม็ดชีวภัณฑ์เชื้อรา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แบ่งอาหารใส่จานเลี้ยงเชื้อ และวางเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ที่เตรียมไว้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตามข้อ 1.1 ลงบนอาหารแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง near UV และ cool white fluorescent นาน 14 วัน ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำต่ออาหาร บันทึกผลการทดลองโดยตรวจวัดขนาดโคโลนีของเชื้อรา

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* บนอาหารแต่ละชนิด โดยนำข้อมูลที่ได้จากแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R stat version 2.13.1 ทำการวิเคราะห์ Least significant difference (LSD) เพื่อหาความแตกต่างทางสถิติ

3.3.3 การศึกษาความมีชีวิตของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ด

นำเม็ดชีวภัณฑ์เชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* สูตรที่ 1 ซึ่งมีส่วนผสมของสารจับติดที่ผ่านการคัดเลือก คือ polyvinyl pyrrolidone K30 (PVP K30) และเม็ดชีวภัณฑ์เชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ตามสูตรดังกล่าวแต่มีการเพิ่มปริมาณของเชื้อราอีกหนึ่งเท่า (สูตรที่ 1+) ที่มีอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 10, 20 และ 30 วัน อย่างละ 1 เม็ด ใส่ลงในน้ำที่ผสม 0.05% tween 80 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร จากนั้นทำ serial dilution เพื่อตรวจวัดปริมาณเชื้อโดยวิธีการ spread plate บนอาหาร PDA บันทึกข้อมูลโดยตรวจนับโคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ที่เจริญบนอาหาร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราที่มีการใช้ประโยชน์ในระบบควบคุมทางชีวภาพ

1.1 ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum*

จากการเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* บนอาหาร PDA, PDAC1, PDAC2, PCA และ YPA เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน พบว่าการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดบนอาหารที่ใช้ทดสอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4) โดยเชื้อรา *B. bassiana* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร PDA, PDAC2 และ PDAC1 เมื่อเวลา 14 วัน มีค่าเท่ากับ 47.88, 47.19 และ 45.50 มิลลิเมตรตามลำดับ และมีลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารแต่ละชนิดแตกต่างกัน (ภาพที่ 1) โดยโคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหาร PDA จะมีสีขาวอมเหลืองลักษณะเป็นวงซ้อนกัน (concentric ring) เส้นใยสีขาวเรียบ หนา มีการสร้างสปอร์เป็นผงละเอียดคล้ายฝุ่นแป้งโคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหาร PDAC1 มีสีขาวอมเหลืองลักษณะเส้นใยฟูหนา โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหาร PDAC2 จะมีลักษณะคล้ายกับบนอาหาร PDA แต่เส้นใยจะฟูมากกว่าเล็กน้อย ส่วนโคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหาร PCA มีสีขาวอมเหลืองลักษณะเป็นวงซ้อนกัน เส้นใยละเอียด โคโลนีแบนราบบาง มีการสร้างสปอร์เป็นผงละเอียดคล้ายฝุ่นแป้งและโคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหาร YPA มีสีขาว ลักษณะเส้นใยตรงกลางฟูหนา ส่วนบริเวณขอบโคโลนีเส้นใยจะฟูเล็กน้อย บาง และมีการเจริญของเส้นใยเป็นวงซ้อนกัน

ขณะที่เชื้อรา *C. globosum* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร YPA และ PDAC2 มีขนาดโคโลนีเท่ากับ 76.50 และ 74.31 มิลลิเมตร ตามลำดับ ภายในเวลา 14 วัน (ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร PDA ซึ่งมีขนาดโคโลนีเท่ากับ 69.63 มิลลิเมตร และมีลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารแต่ละชนิดแตกต่างกัน (ภาพที่ 2) โดยโคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหาร PDA, PDAC1 และ PDAC2 จะมีลักษณะเหมือนกัน เชื้อรามีการเจริญเป็นวงซ้อนกัน เส้นใยหนามีสีขาว ฟูเล็กน้อย ขอบไม่เรียบ เริ่มมีการสร้าง perithecium ลักษณะเป็นเม็ดสีน้ำตาลเข้มในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง โดยในระยะแรกพบการกระจายตัวบริเวณตรงกลาง ต่อมา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จะสร้างทั่วทั้งโคโลนี ส่วนเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหาร PCA มีโคโลนีลักษณะไม่เป็นวงกลม เชื้อรามีการเจริญเป็นวงซ้อนกัน เส้นใยบางมีสีขาว ไม่ฟู ขอบไม่เรียบ มีการเจริญเป็นวงซ้อนกัน เริ่มมีการสร้าง perithecium ช้ากว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับอาหารที่มี PDA เป็นส่วนประกอบ โดยในระยะแรกพบการกระจายตัวบริเวณตรงกลางต่อมาจะสร้างเพิ่มขึ้นแต่ไม่ทั่วทั้งโคโลนี และเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหาร YPA มีโคโลนีลักษณะเป็นทรงกลม เส้นใยหนามีสีขาว ขอบไม่เรียบ มีการเจริญเป็นวงซ้อนกัน ในระยะแรกเส้นใยจะฟูค่อนข้างมาก ต่อมาเส้นใยจะฟุบลงไม่ฟู มีการสร้าง perithecium เพียงเล็กน้อยบริเวณกลางโคโลนี โดยจะเริ่มสร้างในวันเดียวกับบนอาหารที่มี PDA เป็นส่วนประกอบ

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า อาหาร PDA นั้นมีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อราได้ดี ซึ่งตรงกับรายงานหลายฉบับ (กฤษณา, 2534;สุมินตรา; 2540; Senthamizhlselvan *et al*., 2010) ที่พบว่า อาหาร PDA สนับสนุนการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราหลายชนิด เนื่องจาก PDA เป็นสูตรอาหารที่มีปริมาณธาตุอาหารที่อุดมสมบูรณ์ สำหรับอาหาร PDA ที่มีการเติม chitosan (PDAC1, PDAC2) จะพบว่าเชื้อรามีการเจริญเติบโตได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อราที่ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชนั้นมีความต้านทานต่อ chitosan มากกว่าเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยเชื้อราดังกล่าวสามารถผลิต chitinolytic enzymes ได้ปริมาณมากซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการเข้าทำลายศัตรูพืช (Palma-Guerrero *et al*., 2008) เช่น เชื้อรา *Beauveria* sp. เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงและสามารถผลิตเอนไซม์ chitinase ได้ปริมาณมาก ซึ่ง chitin เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างแมลง เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

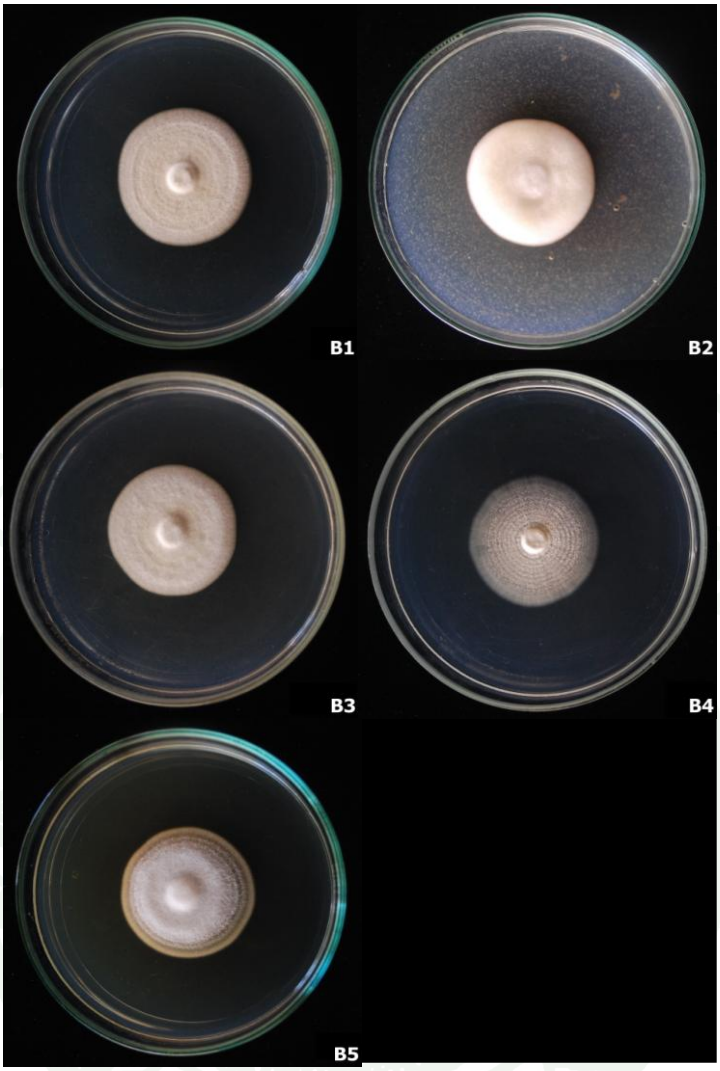
ตารางที่ 4 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 14 วัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ[2/]	ขนาดโคโลนีของเชื้อรา (มม.)[1/]	
	B. bassiana	*C. globosum*
PDA	47.88a	69.63bc
PDAC1	45.50ab	67.69c
PDAC2	47.19a	74.31ab
PCA	42.19c	67.38c
YPA	43.25bc	76.50a
C.V. %	4.49	5.92

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้วิธี Least significant difference (LSD) (P= 0.05)

[2/]สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* : potato dextrose agar (PDA), potato carrot agar (PCA), PDA + 0.1% chitosan (PDAC1), PDA + 0.2% chitosan (PDAC2) และ yeast extract peptone agar (YPA)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่เจริญบนอาหารชนิดต่างๆที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

B1 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหาร PDA

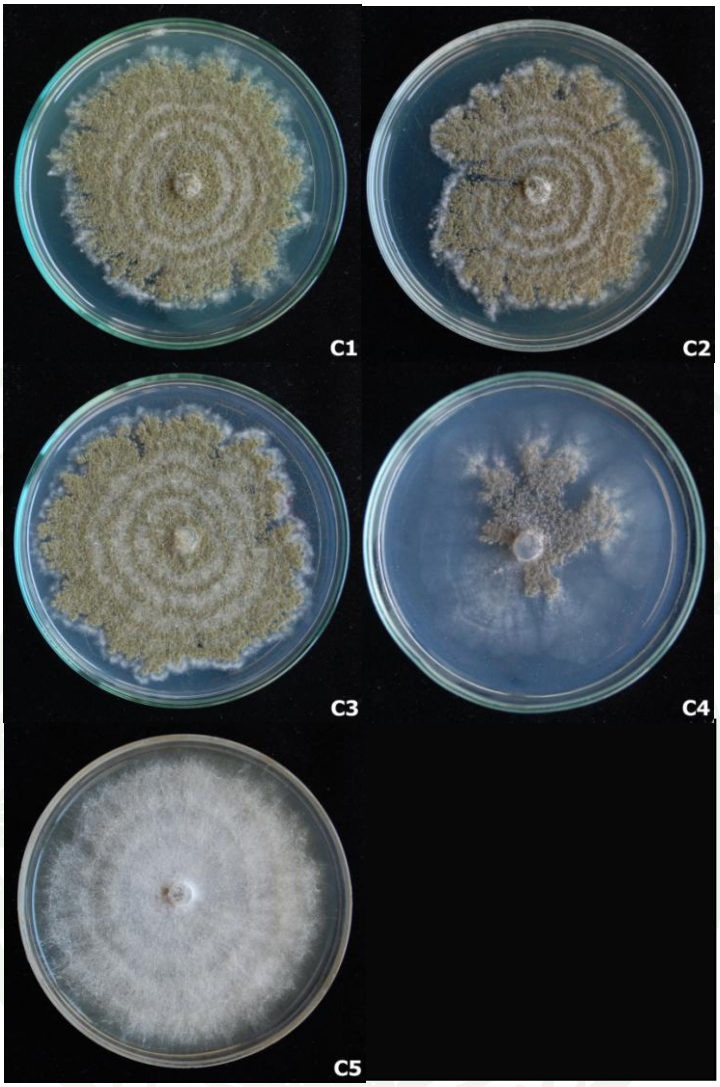
B2 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่ผสมผงไคโตซาน (PDAC1)

B3 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่ผสมไคโตซานปูแดง (PDAC2)

B4 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหาร PCA

B5 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหาร YPA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ที่เจริญบนอาหารชนิดต่างๆที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

C1 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหาร PDA

C2 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่ผสมผงไคโตซาน (PDAC1)

C3 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่ผสมไคโตซานปูแดง (PDAC2)

C4 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหาร PCA

C5 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหาร YPA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 ศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum*

การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* โดยใช้อาหาร PDA ซึ่งปรับค่า pH ระดับ 5.5, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 เลี้ยงในอุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน พบว่า ค่า pH มีผลต่อการเจริญของเชื้อราแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเชื้อรา *B. bassiana* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดใน pH 9.0 มีขนาดโคโลนีเท่ากับ 54.38 มิลลิเมตร (ตารางที่ 5) ในขณะที่อาหาร PDA pH 5.5 การเจริญเท่ากับ 47.88 มิลลิเมตร ซึ่งผลที่ได้อาจแตกต่างกับรายงานของ Karthikeyan *et al*. (2008) ที่พบว่า pH 6-8 เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDB เป็นเวลา 5-7 วัน เนื่องจากเชื้อราชนิดเดียวกัน แต่มีการแยกมาจากแหล่งและแมลงที่ต่างกัน ก็จะมีคุณสมบัติเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH ที่แตกต่างกัน สำหรับเชื้อรา *C. globosum* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในช่วง pH 5.5 และ 6.0 มีขนาดโคโลนีเท่ากับ 69.63 และ 65.19 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งตรงกับรายงานของสุมินตรา (2540) ที่พบว่า *C. cupreum* และ *C. globosum* มีการเจริญเติบโตและสามารถสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร PDA ที่ระดับ pH 5.0-6.0

ตารางที่ 5 ผลของค่า pH ต่อการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน

pH	ขนาดโคโลนีของเชื้อรา (มม.) [1/]	
	B. bassiana	*C. globosum*
5.5	47.88b	69.63a
6.0	41.50c	65.19ab
7.0	43.25c	57.63c
8.0	44.19c	61.25b
9.0	54.38a	57.94c
C.V. %	4.27	6.98

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้วิธี Least significant difference (LSD) (P= 0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 ศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum*

1.3.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* โดยการเลี้ยงในอาหาร basal medium 1 ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนทดสอบแต่ละชนิด สำหรับเชื้อรา *B. bassiana* จะมีการเติม glucose, fructose, cellobiose และ trehalose ส่วนเชื้อรา *C. globosum* จะมีการเติม glucose, cellulose และ maltose โดยเลี้ยงในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อรา *B. bassiana* มีการเจริญของเส้นใยได้ดีบนอาหารที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนทุกชนิด แต่จะพบว่า อาหารที่มีการเติม fructose มีการสร้างสปอร์ของเชื้อรามากที่สุด คือ 29.15×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 6) โดยน้ำตาลประเภท monosaccharides และ disaccharides เช่น fructose และ sucrose จะสามารถกระตุ้นการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราควบคุมศัตรูพืชได้ (Sun and Liu, 2006) เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ species และ isolate ของเชื้อราแต่ละชนิดด้วย นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า เชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดจะมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน (ภาพที่ 3) โดยโคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่เติม glucose, cellobiose และ trehalose จะมีลักษณะเหมือนกัน คือบริเวณตรงกลางโคโลนีเส้นใยมีสีขาวหนา ฟูปานกลาง ส่วนปลายโคโลนีเส้นใยจะเจริญบางกว่า โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่เติม fructose มีลักษณะเส้นใยสีขาว หนา ฟูเล็กน้อย และโคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนมีลักษณะเส้นใยสีขาว บางเรียบไปกับอาหาร

ขณะที่เชื้อรา *C. globosum* เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารที่มีการเติม cellulose และ glucose โดยพบการเจริญของเส้นใยมีค่าเท่ากับ 87.75 และ 82.75 มิลลิเมตร (ตารางที่ 6) ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า เชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดจะมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน (ภาพที่ 4) โดยโคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่เติม glucose และอาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญของเส้นใยเพียงอย่างเดียว ส่วนอาหารที่มีการเติม cellulose และ maltose จะมีการเจริญของทั้งเส้นใยเชื้อรา *C. globosum* และการสร้าง perithecium ซึ่งมีความแตกต่างในส่วนของขนาดและการกระจายตัวของ perithecium โดยใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

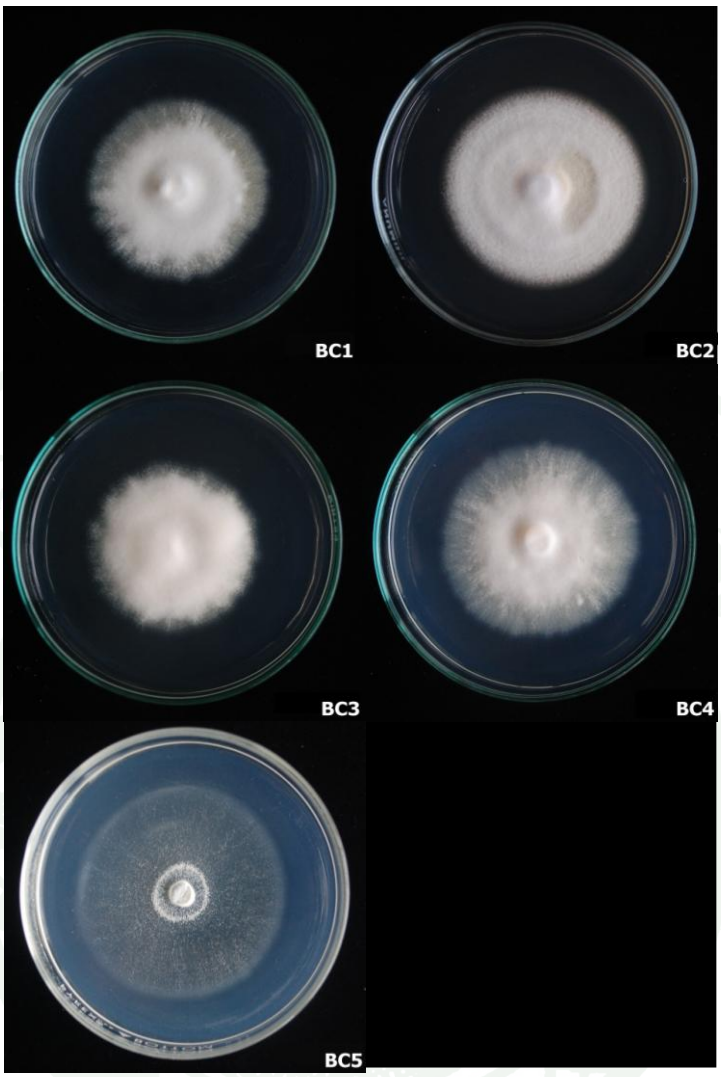
อาหารที่มี cellulose จะมีขนาดใหญ่และการกระจายตัวอยู่ทั่วทั้งโคโลนีเชื้อรา ขณะที่อาหารที่เติม maltose มีการสร้าง perithecium ขนาดเล็กกว่าอยู่บริเวณตรงกลางโคโลนีของเชื้อรา นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่เติม cellulose จะพบการสร้าง perithecium ที่เร็วกว่าเมื่อเทียบกับอาหารที่ผสมแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ซึ่งตรงกับรายงานของ Basu and Bose (1950) ที่พบว่า cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนที่สนับสนุนการเจริญและการสร้าง perithecium ของเชื้อรา *Chaetomium* sp. เนื่องจากการสร้าง perithecium ของเชื้อรามีความเกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ได้ โดยอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ได้เริ่มต้นต่ำจะกระตุ้นให้เชื้อราสามารถสร้าง perithecium ได้รวดเร็วกว่า แต่หากมีปริมาณกลูโคสเริ่มต้นต่ำมากเกินไปก็จะทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ดังนั้นอาหารที่เติมน้ำตาล polysaccharides จะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าอาหารที่เติมน้ำตาล monosaccharides และ disaccharides จึงกระตุ้นให้เชื้อราสร้าง perithecium ได้รวดเร็วกว่า

ตารางที่ 6 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน

แหล่งคาร์บอน	*B. bassiana*[1/]		แหล่งคาร์บอน	*C. globosum*[1/]
	ขนาดโคโลนีของเชื้อรา (มม.)	การสร้างสปอร์ ($\times 10^8$ สปอร์/มล.)		ขนาดโคโลนีของเชื้อรา (มม.)
Glucose	50.00a	5.44bc	Glucose	82.75a
Fructose	49.19a	29.15a	Cellulose	87.75a
Cellobiose	42.56b	6.01b	Maltose	65.00b
Trehalose	47.94ab	2.90d		
Control (no C sources)	49.00a	4.19cd	Control (no C sources)	45.13c
C.V.(%)	2.97	12.32		7.74

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้วิธี Least significant difference (LSD) (P= 0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่เจริญบนอาหาร basal medium 1 ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน

BC1 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม glucose

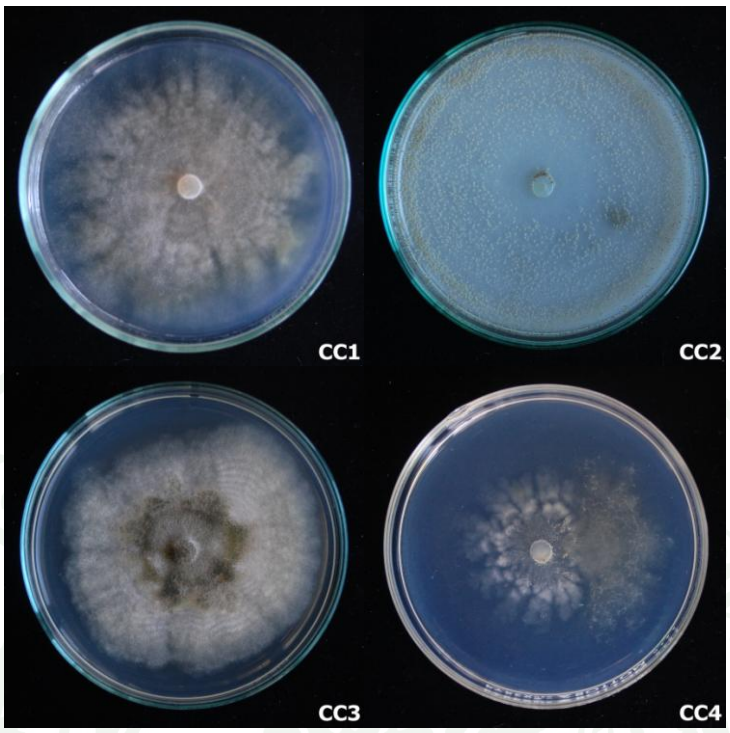
BC2 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม fructose

BC3 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม cellobiose

BC4 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม trehalose

BC5 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ที่เจริญบนอาหาร basal medium 1 ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน

CC1 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม glucose

CC2 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม cellulose

CC3 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม maltose

CC4 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* โดยทำการเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* ในอาหาร basal medium 2 ที่มีการเติม arginine, phenylalanine, tryptophan และ KNO_3 ส่วนเชื้อรา *C. globosum* จะทำการเลี้ยงในอาหาร basal medium 3 ที่มีการเติม asparagine, glutamine, peptone และ $NaNO_3$ ซึ่งเลี้ยงในอุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 14 วัน

จากผลการทดลองพบว่า อาหารที่มีการเติม arginine และ KNO_3 จะกระตุ้นการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *B. bassiana* ให้มีการเจริญของเส้นใยเชื้อราดีที่สุดมีค่าเท่ากับ 45.13 และ 43.88 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น แต่อาหารที่เติม KNO_3 จะพบการสร้างสปอร์มากที่สุด คือ 5.58×10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 7) ผลของ KNO_3 ในการกระตุ้นการสร้างสปอร์ตรงกับรายงานของ Campbell *et al*. (1978) ซึ่งพบว่า KNO_3สามารถกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ได้ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า เชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน (ภาพที่ 5) โดยโคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่เติม arginine และ KNO_3 มีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ เชื้อรามีการเจริญเป็นวงซ้อนกัน เส้นใยสีขาว หนา มีการสร้างสปอร์เป็นผงละเอียดคล้ายแป้ง สีขาวอมเหลือง แต่โคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารที่เติม arginine มีการเจริญเป็นวงซ้อนกันมากกว่าอาหารที่เติม KNO_3 ส่วนโคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่เติม phenylalanine และ tryptophan มีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ เส้นใยของเชื้อราจะฟูมากทั้งโคโลนี มีสีขาว และโคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนพบว่า เส้นใยจะเจริญบางเรียบไปกับอาหาร

ส่วนการเจริญของเชื้อรา *C. globosum* บนแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่ทดสอบไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต (ตารางที่ 7) แต่จากภาพที่ 6 จะพบการสร้าง perithecium บนอาหารที่มีการเติม asparagine และ peptone ซึ่งตรงกับรายงานของ Basu and Bose (1950) ที่พบว่า peptone และ asparagine เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่สนับสนุนการเจริญและการสร้าง perithecium ของเชื้อรา *Chaetomium* sp. นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า เชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดจะมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน (ภาพที่ 6) โดยโคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่เติม asparagine มีลักษณะการเจริญของเส้นใยหนา และมีการสร้าง perithecium ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วทั้งโคโลนี แต่โคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารที่เติม peptone

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

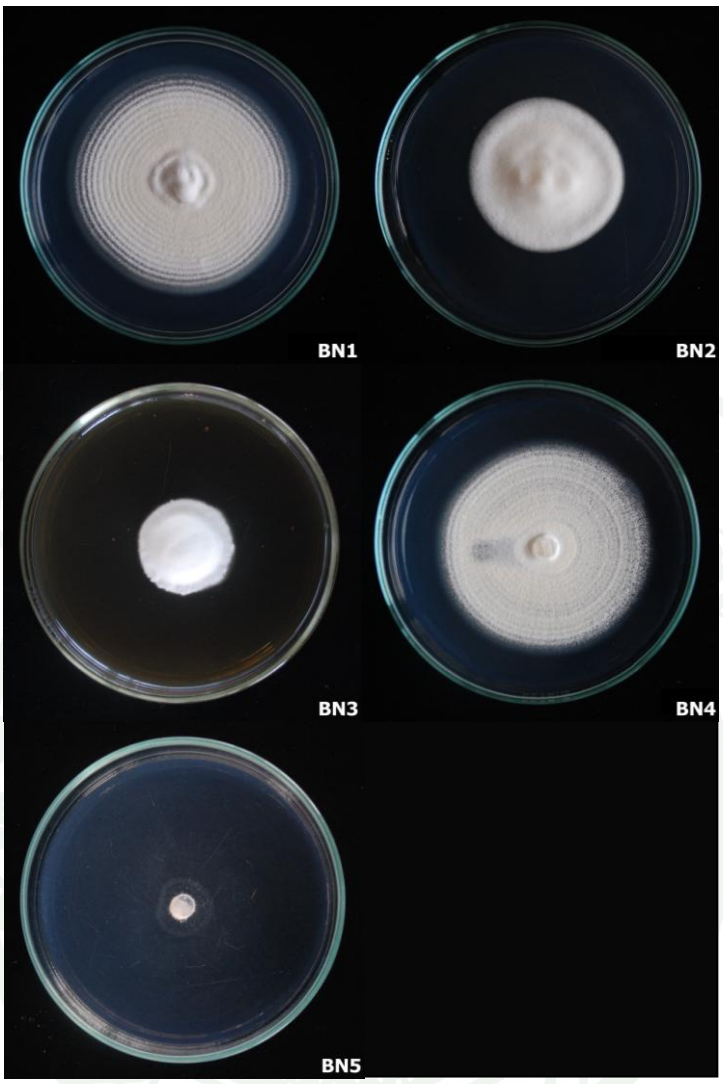
มีการเจริญของเส้นใยหนาบริเวณตรงกลาง แต่ปลายโคโลนีเส้นใยจะเจริญบางกว่า มีการสร้าง perithecium ขนาดใหญ่อยู่บริเวณเฉพาะตรงกลางโคโลนี ส่วนโคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่เติม glutamine และ $NaNO_3$ มีลักษณะเหมือนกัน คือ เส้นใยของเชื้อราฟูมากทั้งโคโลนี ไม่พบการสร้าง perithecium และโคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนพบว่า เส้นใยเจริญบางเรียบไปกับอาหาร มีการสร้าง perithecium เล็กน้อยบริเวณรอบๆ ชิ้นวุ้น

ตารางที่ 7 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 วัน

	B. bassiana[1/]			*C. globosum*[1/]
แหล่งไนโตรเจน	ขนาดโคโลนีของเชื้อรา (มม.)	การสร้างสปอร์ ($\times 10^8$ สปอร์/มล.)	แหล่งไนโตรเจน	ขนาดโคโลนีของเชื้อรา (มม.)
Arginine	45.13a	19.90b	Asparagine	38.69c
Phenylalanine	31.42c	6.92c	Glutamine	53.56b
Tryptophan	23.81d	11.31c	Peptone	56.25b
KNO_3	43.88a	55.77a	$NaNO_3$	37.81c
Control (no N sources)	41.38b	0.0001d	Control (no N sources)	79.63a
C.V.(%)	3.24	16.61		6.59

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้วิธี Least significant difference (LSD) (P= 0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่เจริญบนอาหาร basal medium 2 ซึ่งมีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน

BN1 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม arginine

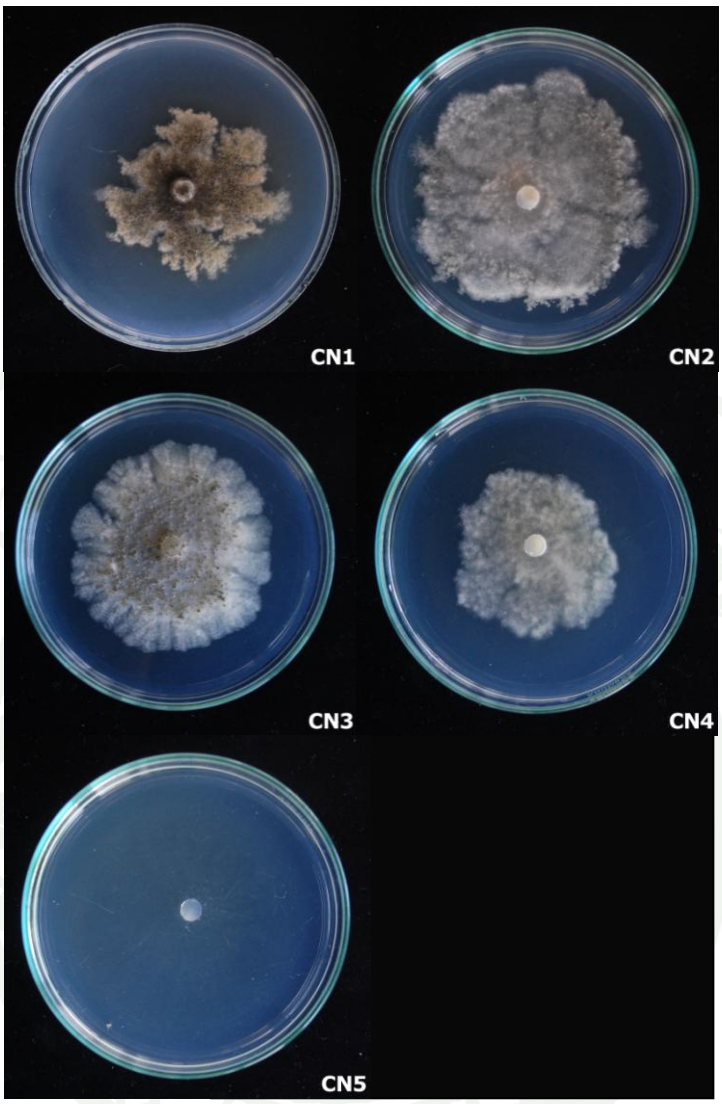
BN2 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม phenylalanine

BN3 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม tryptophan

BN4 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม KNO_3

BN5 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ที่เจริญบนอาหาร basal medium 3 ที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน

CN1 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม asparagine

CN2 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม glutamine

CN3 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม peptone

CN4 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่มีการเติม $NaNO_3$

CN5 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 ทดสอบสูตรอาหารซึ่งพัฒนาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum*

เมื่อนำชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่สำคัญสำหรับเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* มาปรับปรุงเป็นสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและการสร้างสปอร์ พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* สามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีที่สุดบนอาหาร PFA ที่เติม KNO_3 (ภาพที่ 7:MB3) มีค่าเท่ากับ 52.63 มิลิเมตร (ตารางที่ 8) โดยเชื้อราเจริญดีที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PFA และอาหารสูตร Basal medium ที่ผสมสารต่างๆ และยังให้สปอร์ความเข้มข้นที่สูงถึง 5.11×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้อาหาร PFA และ basal medium ที่มีการเติม fructose และ KNO_3 (MB3, MB5) พบว่าจะมีการเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์ได้ดีกว่าอาหารที่มีการเติมเพียง fructose (MB2, MB6) หรือ KNO_3 (MB4) เพียงอย่างเดียว

ขณะที่เชื้อรา *C. globosum* สามารถเจริญได้มากที่สุดบนอาหาร basal medium 3 ที่เติม asparagine และ cellulose (MC7) โดยเส้นใยเจริญได้ถึง 90.00 มิลลิเมตร รองลงมาได้แก่ PCA ที่เติม chitosan (MC3) คือ 85.69 มิลลิเมตร และเป็นอาหารที่มีการสร้างสปอร์ของเชื้อรามากที่สุด คือ 1.55×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. globosum* เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร PDA ที่เติม chitosan (ภาพที่ 7:MC2) ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปนั้นไม่มีผลต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อราแต่อาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อราดังกล่าว ทั้งนี้สัดส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีในสูตรอาหารอาจมีผลต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราด้วย (Gao and Liu, 2010)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ผลของสูตรอาหารซึ่งพัฒนาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน

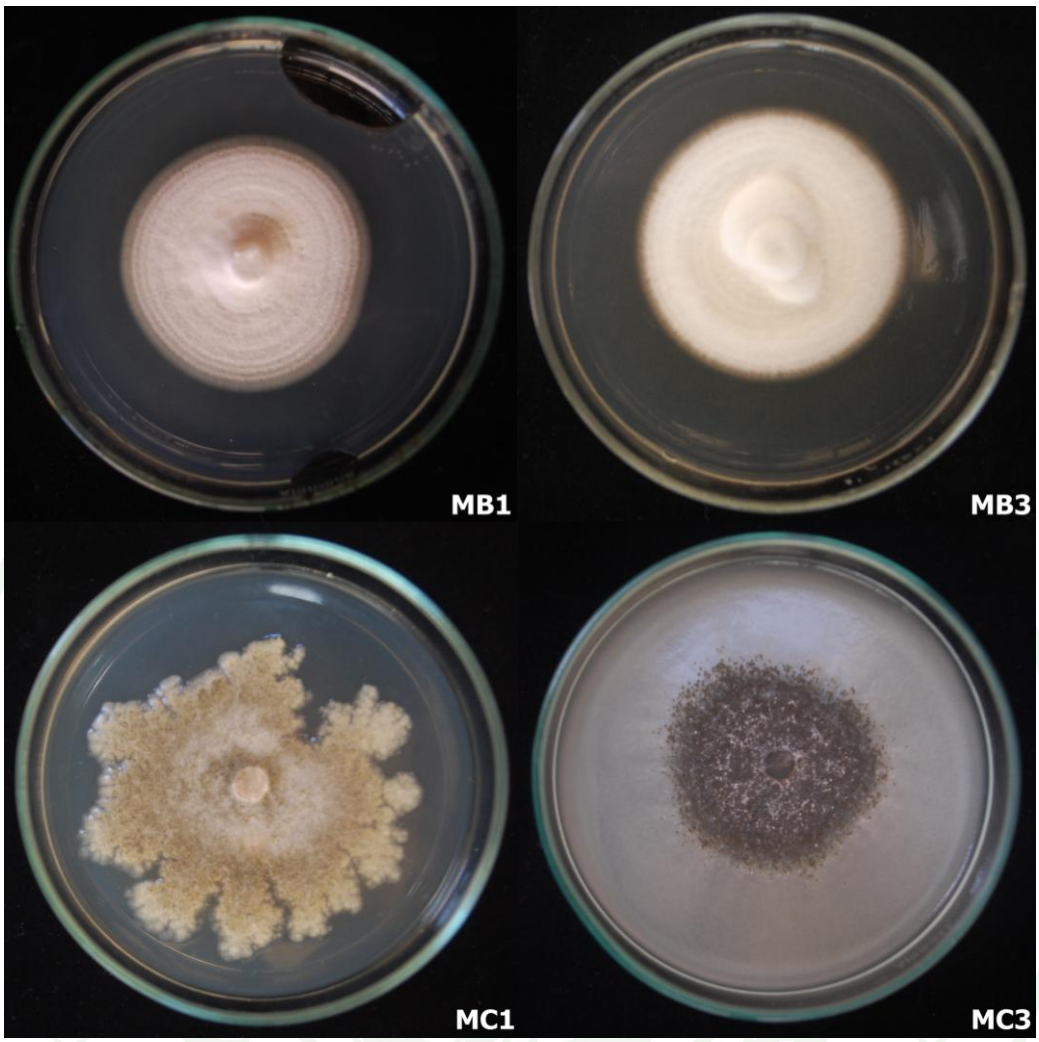
	B. bassiana			*C. globosum*	
อาหารเลี้ยงเชื้อ	ขนาดโคโลนีของเชื้อรา (มม.)	การสร้างสปอร์ ($\times 10^8$ สปอร์/มล.)	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ขนาดโคโลนีของเชื้อรา (มม.)	การสร้างสปอร์ ($\times 10^5$ สปอร์/มล.)
MB1[2/]	49.19ab[1/]	2.02c	MC1[3/]	62.06d	3.15b
MB2	42.19c	3.45b	MC2	61.81d	1.03c
MB3	52.63a	5.11a	MC3	85.69ab	15.48a
MB4	51.25a	0.26d	MC4	80.38bc	0.53c
MB5	49.31ab	0.43d	MC5	51.63e	0.0001c
MB6	44.69c	0.31d	MC6	78.75c	0.0001c
MB7	45.69bc	0.47d	MC7	90.00a	0.0001c
C.V.(%)	5.21	10.94		6.41	31.27

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้วิธี Least significant difference (LSD) (P= 0.05)

[2/]สูตรอาหารซึ่งพัฒนาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* : PDA (MB1), potato fructose agar(PFA) (MB2), PFA+KNO_3 (MB3), basal medium agar 1(BMA1)+KNO_3 (MB4), BMA1+KNO_3+fructose (MB5), BMA2+fructose (MB6), BMA2+KNO_3+fructose (MB7)

[3/]สูตรอาหารซึ่งพัฒนาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. globosum* : PDA (MC1), PDA+chitosan (MC2), potato cellulose agar (PCA)+chitosan (MC3), PCA+chitosan+asparagine (MC4), BMA3+asparagine (MC5), BMA3+cellulose (MC6), BMA3+asparagine+ cellulose (MC7)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ที่เจริญบนอาหารซึ่งพัฒนาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

MB1 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหาร PDA

MB3 โคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหาร Potato fructose agar (PFA) ที่เติม KNO_3

MC1 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหาร PDA

MC3 โคโลนีของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนอาหาร potato cellulose agar (PCA) ที่เติม chitosan

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ทดสอบการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* บนวัสดุธรรมชาติ

2.1 การคัดเลือกวัสดุธรรมชาติที่เหมาะสม

จากการนำวัสดุธรรมชาติมาใช้ในการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ได้แก่ ข้าว ข้าวเปลือก และข้าวโพดบด โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง cool white fluorescent นาน 28 วัน โดยตรวจนับปริมาณเชื้อราทุกๆ 7 วัน พบว่า ในระยะเวลา 14 วันแรกหลังจากปลูกเชื้อรา เชื้อรา *B. bassiana* สามารถเพิ่มปริมาณในวัสดุธรรมชาติทุกชนิดได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีปริมาณเชื้อราอยู่ในช่วงระหว่าง 2.44-4.67 × 10^8 โคโลนีต่อกรัม (ตารางที่ 9) หลังจากนั้นมีการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* บนวัสดุธรรมชาติชนิดต่างๆได้ดีแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยในวันที่ 21 หลังจากการปลูกเชื้อ พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* สามารถเพิ่มปริมาณได้มากที่สุดเมื่อเจริญบนข้าว มีค่าเท่ากับ 350.25 × 10^8 โคโลนีต่อกรัม ส่วนบนข้าวโพดบดและข้าวเปลือกมีการเพิ่มปริมาณของเชื้อราได้ดีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 102.75 × 10^8 และ 86.25 × 10^8 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* จะเริ่มลดลงเล็กน้อยในวันที่ 28 หลังจากการปลูกเชื้อ โดยพบว่า เชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนข้าวจะมีปริมาณมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 237.00 × 10^8 โคโลนีต่อกรัม รองลงมาคือ ข้าวโพดบด โดยมีปริมาณเท่ากับ 97.50 × 10^8 โคโลนีต่อกรัม และพบว่า เชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนข้าวเปลือกจะมีปริมาณน้อยที่สุด ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 10^8 โคโลนีต่อกรัม

ส่วนการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* บนวัสดุธรรมชาติ พบว่า ปริมาณของเชื้อราที่เจริญบนวัสดุธรรมชาติแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันตั้งแต่ในระยะแรก โดยในวันที่ 7 หลังจากการปลูกเชื้อ พบว่า เชื้อรา *C. globosum* สามารถเพิ่มปริมาณได้มากที่สุดเมื่อเจริญบนข้าวโพดบด มีค่าเท่ากับ 23.25 × 10^4 โคโลนีต่อกรัม (ตารางที่ 10) รองลงมาได้แก่ เชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนข้าวเปลือกและบนข้าว โดยมีปริมาณเท่ากับ 6.14 × 10^4 และ 5.94 × 10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ ต่อมาที่ระยะเวลา 14 วัน พบว่า การเพิ่มปริมาณของเชื้อราบนวัสดุธรรมชาติแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนข้าวโพดบด มีค่าเท่ากับ 11.63 × 10^4 โคโลนีต่อกรัม ส่วนบนข้าวเปลือกและบนข้าว มีปริมาณเท่ากับ 6.98 × 10^4 และ 3.00 × 10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นที่ระยะเวลา 21 วัน พบว่า ปริมาณของเชื้อราที่เจริญบนวัสดุธรรมชาติชนิดต่างๆมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนข้าวโพดบด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มีการเพิ่มปริมาณมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 688.50×10^4 โคโลนีต่อกรัม รองลงมา คือ บนข้าวเปลือก มีค่าเท่ากับ 374.25×10^4 โคโลนีต่อกรัม และบนข้าวมีการเพิ่มปริมาณน้อยที่สุด มีค่าเท่ากับ 2.31×10^4 โคโลนีต่อกรัม หลังจากนั้นปริมาณของเชื้อราจะเริ่มลดลงในวันที่ 28 หลังจากการปลูกเชื้อ โดยพบว่า เชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนข้าวโพดบดจะมีปริมาณเท่ากับ 276.75×10^4 โคโลนีต่อกรัม รองลงมาได้แก่ บนข้าวเปลือก มีปริมาณเท่ากับ 140.18×10^4 โคโลนีต่อกรัม ส่วนบนข้าวมีปริมาณน้อยที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.92×10^4 โคโลนีต่อกรัม

นอกจากนี้ยังได้นำตัวอย่างของวัสดุธรรมชาติชนิดต่างๆมาสำรวจการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* และการสร้าง perithecium ของเชื้อรา *C. globosum* ภายใต้กล้อง stereo microscope พบว่า เชื้อราทั้งสองชนิดเริ่มมีการสร้างส่วนขยายพันธุ์ดังกล่าวแล้วที่ระยะเวลา 4 วัน หลังการปลูกเชื้อ (ภาพที่ 8,9)

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อราทั้งสองชนิดจมีการเพิ่มปริมาณมากที่สุดในวันที่ 21ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นจะเริ่มมีปริมาณลดลง เนื่องจากในช่วงระยะเวลา 21 วัน วัสดุธรรมชาติชนิดต่างๆมีปริมาณธาตุอาหารเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิด ต่อมาธาตุอาหารจะเริ่มลดลงทำให้ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลให้ต่อมาปริมาณของเชื้อราเริ่มลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อรา *B. bassiana* สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุดเมื่อเจริญบนข้าว รองลงมาคือ ข้าวโพดบด ซึ่งเชื้อราดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตได้ดีเช่นกัน ผลที่ได้นั้นตรงกับรายงานของวิวัฒน์ และคณะ (2554) ที่ทำการเพิ่มปริมาณโคนิเดียของเชื้อรา *B. bassiana* ในเมล็ดธัญพืช 4 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวเสาไห้และปลายข้าวกล้อง ในระยะเวลา 28 วัน พบว่า เชื้อราสร้างโคนิเดียบนปลายข้าวกล้องมากที่สุดเท่ากับ 4.13×10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ข้าวเสาไห้ ข้าวโพดและข้าวฟ่าง ตามลำดับ เนื่องจากข้าวนั้นมีปริมาณของแหล่งคาร์โบไฮเดรตมากกว่าธัญพืชชนิดอื่นๆที่ใช้ในการทดสอบ (Wikipedia, 2014) ส่วนข้าวเปลือกจะมีปริมาณเชื้อน้อยที่สุดเนื่องจากมี cellulose และ lignin ปกคลุมพื้นที่ผิว ทำให้เชื้อรา *B. bassiana* มีการเจริญและเพิ่มปริมาณได้ไม่ดีเท่ากับธัญพืชชนิดอื่น (ประสิทธิ์, 2553) แต่การนำข้าวมาใช้ในการเพิ่มปริมาณในการทดลองนี้จะพบปัญหาในขั้นตอนการเตรียมข้าวเพื่อนำมาใช้ปลูกเชื้อ เนื่องจากข้าวมีคุณภาพใหม่เก่าต่างกัน เมื่อนำมาเตรียมตามอัตราส่วนที่ระบุไว้ในวิธีการบางครั้งข้าวจะสุกเกินไปทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้ อีกทั้งการเพิ่มปริมาณของเชื้อราบนข้าวโพดบดสามารถเก็บรักษาเชื้อราได้นานกว่าบนข้าว ส่วนเชื้อรา *C. globosum* จะเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุดเมื่อเจริญบนข้าวโพดบด รองลงมาคือ ข้าวเปลือก เนื่องจากเชื้อรา *Chaetomium* sp.จะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เจริญเติบโตได้ดีบนวัสดุที่มี cellulose เป็นส่วนประกอบ (Basu and Bose,1950) ซึ่งข้าวโพดบดและข้าวเปลือกนั้นมี cellulose เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงได้คัดเลือกข้าวโพดบดไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.2 ศึกษาผลของการเพิ่มแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในวัสดุธรรมชาติในการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา

จากข้อมูลที่ได้ในการทดลองข้อ 2.1 พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีเมื่อเจริญบนข้าวโพดบด จึงได้ทำการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมลงในข้าวโพด ดังนี้ ข้าวโพดที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* จะเติม fructose และ KNO_3 ส่วนเชื้อรา *C. globosum* เติม cellulose และ chitosan โดยทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง cool white fluorescent นาน 28 วัน โดยตรวจนับปริมาณเชื้อราทุกๆ 7 วัน พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนข้าวโพดบดที่มีการเติม fructose และ KNO_3 มีปริมาณของเชื้อราไม่แตกต่างกันกับข้าวโพดบดปกติ ในทุกระยะเวลาของการเลี้ยง (ตารางที่ 9) แสดงให้เห็นว่า ปริมาณธาตุอาหารที่มีในข้าวโพดมีเพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* อยู่แล้ว ดังนั้นการเติมธาตุอาหารเพิ่มเติมลงไปจึงไม่มีผลในการกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา

ขณะที่การเติม cellulose และ chitosan สามารถกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ได้ในระยะแรกเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวโพดบดปกติ โดยปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนข้าวโพดบดที่มีการเติม cellulose และ chitosan ที่เวลา 7 และ 14 วัน มีค่าเท่ากับ 33.25×10^4 และ 29.25×10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 10) ส่วนปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนข้าวโพดบดปกติ ที่เวลา 7 และ 14 วัน มีค่าเท่ากับ 23.25×10^4 และ 11.63×10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ หลังจากนั้น พบว่า เชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนข้าวโพดบดปกติจะมีการเพิ่มปริมาณของเชื้อรามากกว่าเชื้อราที่เจริญบนข้าวโพดบดที่มีการเติม cellulose และ chitosan โดยปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนข้าวโพดบดปกติ ที่เวลา 21 และ 28 วัน มีค่าเท่ากับ 688.50×10^4 โคโลนีต่อกรัม และ 276.75×10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ ส่วนปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนข้าวโพดบดที่มีการเติม cellulose และ chitosan ที่เวลา 21 และ 28 วัน มีค่าเท่ากับ 344.25×10^4 และ 138.00×10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ แสดงว่าข้าวโพดบดที่มีการเติม cellulose และ chitosan จะกระตุ้นการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อรา *C. globosum* ในระยะแรกอย่างรวดเร็วจึงมีปริมาณของเชื้อรามากกว่าเชื้อราที่เจริญบนข้าวโพดบดปกติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Basu and Bose,1950) ต่อมาแหล่งคาร์บอนที่มีลดลงอย่างมากเช่นกันทำให้ปริมาณเชื้อราลดลงน้อยกว่าเชื้อราที่เจริญบนข้าวโพดบดปกติ

ตารางที่ 9 การเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Beauveria bassiana* บนธัญพืชชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

ชนิดของธัญพืช	จำนวนโคโลนีของเชื้อรา ($\times 10^8$ cfu/g)[1/]			
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
ข้าว	4.29	3.99	350.25a	237.00a
ข้าวเปลือก	0.53	2.44	86.25b	น้อยกว่า10^8c
ข้าวโพดบด	1.34	3.33	102.75b	97.50b
ข้าวโพดบด +Fructose+KNO3	0.92	4.67	150.75b	72.00b
C.V.(%)	140.61	46.82	54.49	44.99

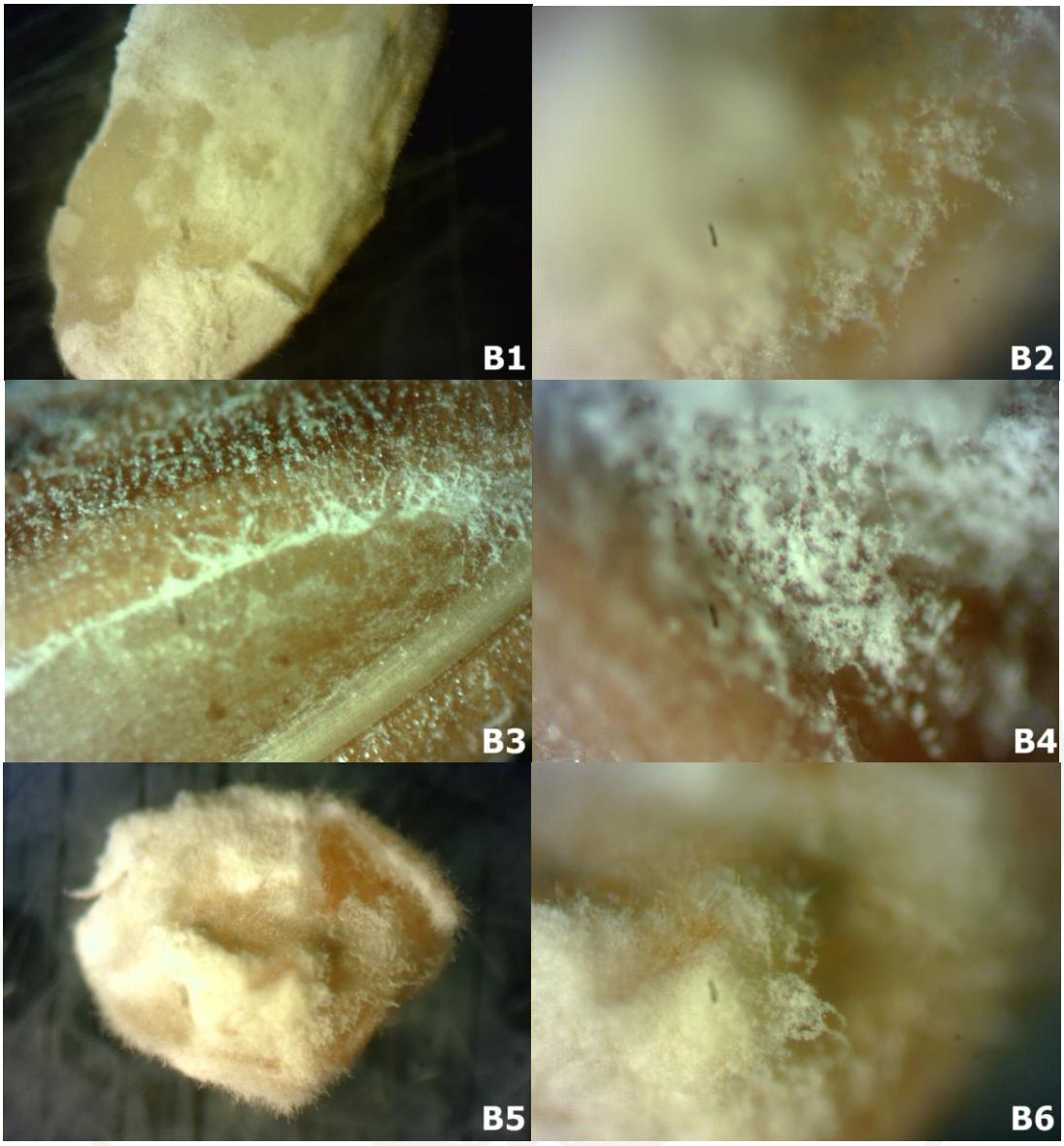
หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้วิธี Least significant difference (LSD) (P= 0.05)

ตารางที่ 10 การเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Chaetomium globosum* บนธัญพืชชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

ชนิดของธัญพืช	จำนวนโคโลนีของเชื้อรา ($\times 10^4$ cfu/g) [1/]			
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
ข้าว	6.14c	3.00b	2.31c	0.92b
ข้าวเปลือก	5.94c	6.98b	374.25b	140.18ab
ข้าวโพดบด	23.25b	11.63b	688.50a	276.75a
ข้าวโพดบด+cellulose+chitosan	33.15a	29.25a	344.25b	138.00ab
C.V.(%)	34.11	67.03	43.97	88.18

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้วิธี Least significant difference (LSD) (P= 0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



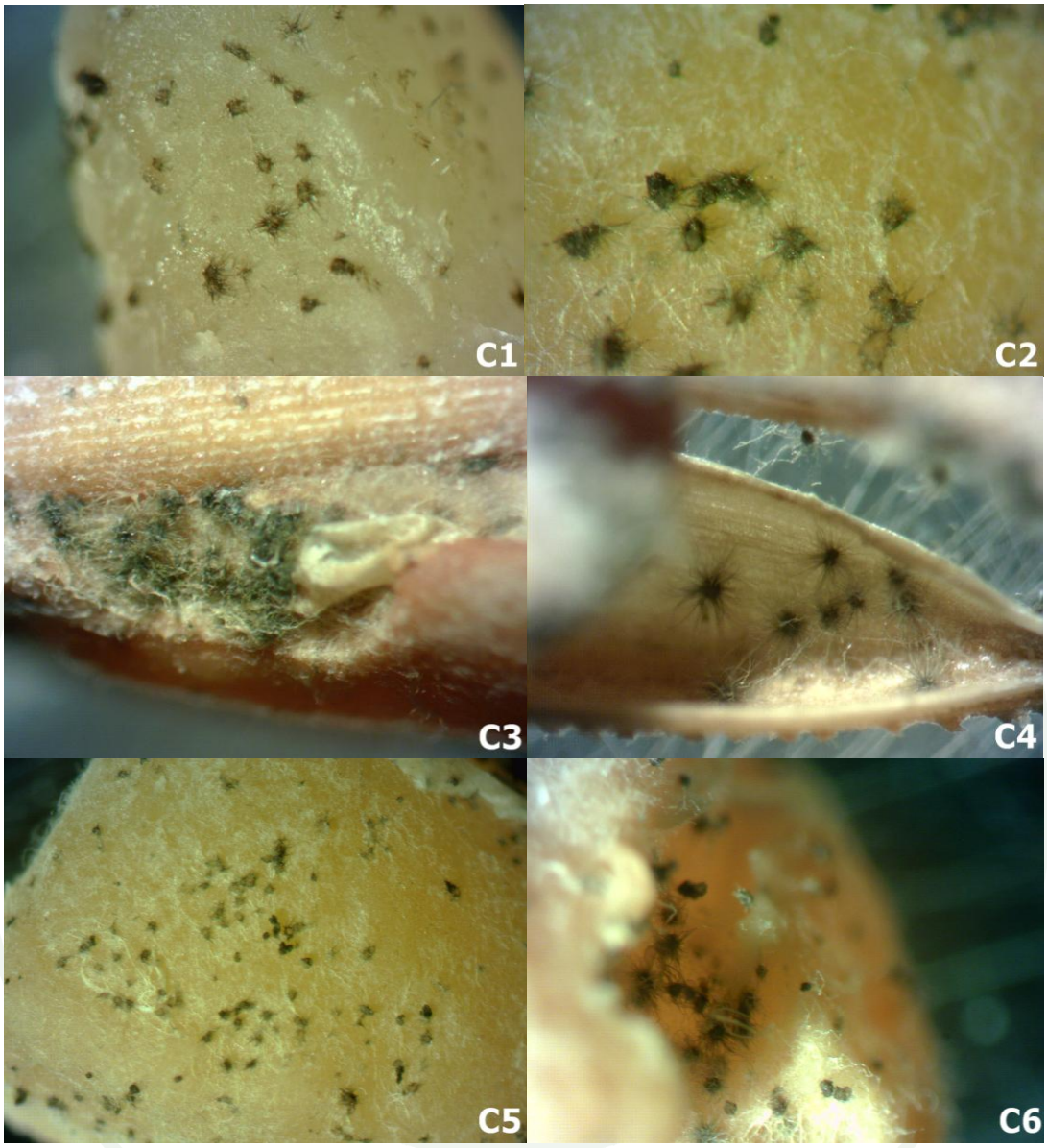
ภาพที่ 8 ลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* บนวัสดุธรรมชาติชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 4 วัน

B1-B2 การเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* บนข้าว

B3-B4 การเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* บนข้าวเปลือก

B5-B6 การเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* บนข้าวโพดบด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 ลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Chaetomium globosum* บนวัสดุธรรมชาติชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 4 วัน

C1-C2 การเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. globosum* บนข้าว

C3-C4 การเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. globosum* บนข้าวเปลือก

C5-C6 การเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. globosum* บนข้าวโพดบด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

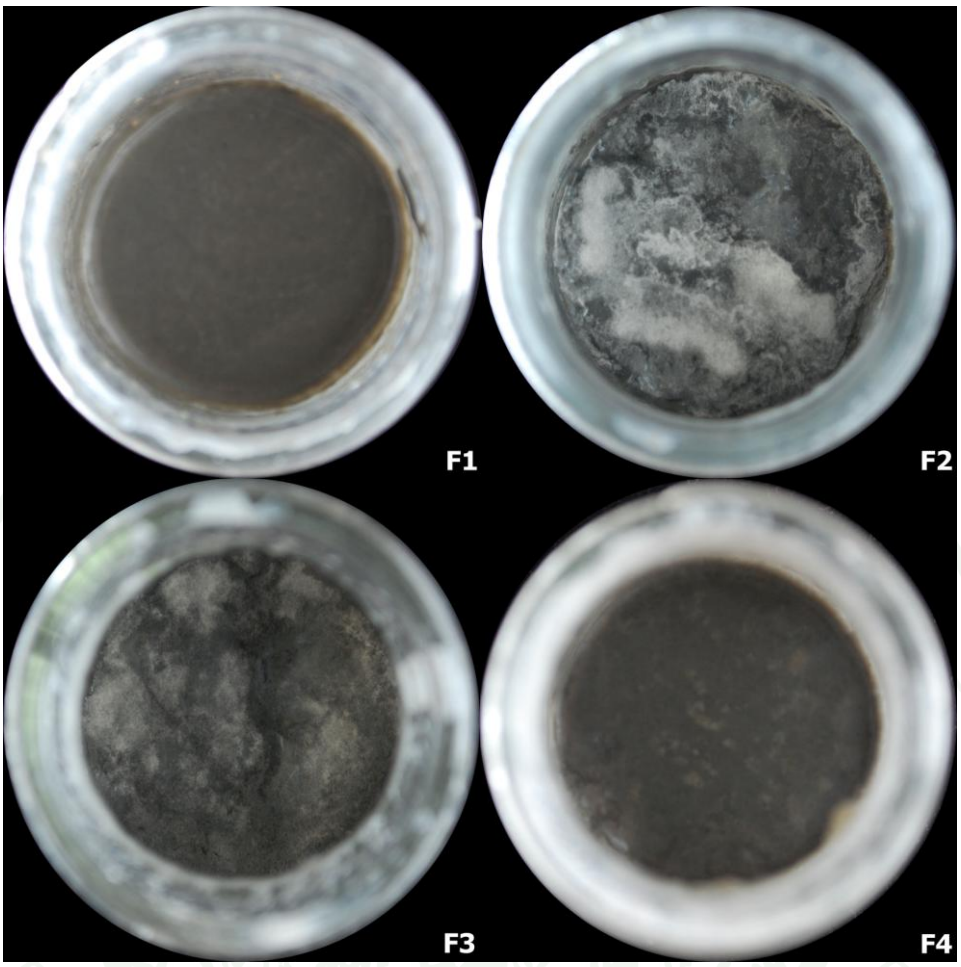
3. การเก็บรักษาเชื้อราที่มีการใช้ประโยชน์ในระบบควบคุมทางชีวภาพในรูปแบบหัวเชื้อหรือชีวภัณฑ์

3.1 การศึกษาวิธีการผลิตชีวภัณฑ์เชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ในรูปแบบของเหลว

จากการนำสารพาชนิดต่างๆ ได้แก่ talc, greencal และ pumice และสารช่วยให้แขวนลอย (suspending agent) ได้แก่ xanthan gum และ sodium aluminium silicate รวมถึงสารลดแรงตึงผิว คือ 0.1% tween 80 โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย เมื่อนำมาผสมกับเชื้อรา *C. globosum* ที่เจริญบนข้าวโพดบดที่ผ่านการปั่นละเอียด พบว่า รูปแบบของสารข้นเหนียวที่ได้ทั้ง 4 สูตรไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเชื้อรา *C. globosum* ในรูปของเหลว เนื่องจากที่ระยะเวลา 3 วันของการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ พบการเจริญของเชื้อราบนผิวหน้าของชีวภัณฑ์เกิดการงอกของเส้นใยเชื้อรา *C. globosum* (ภาพที่ 10)

จากผลการทดลองที่ได้ทำให้ไม่ได้มีการตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อรา *C. globosum* ในชีวภัณฑ์แต่ละสูตร และไม่ได้นำเชื้อรา *B. bassiana* มาผลิตเป็นชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบของเหลวตามสูตรนี้ด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 ลักษณะผิวหน้าของชีวภัณฑ์เชื้อรา *Chaetomium globosum* ในรูปแบบของเหลวตามสูตรต่างๆ

F1 ชีวภัณฑ์เชื้อรา *C. globosum* ในรูปแบบของเหลวสูตรที่ 1 (เติมแร่ talc)

F2 ชีวภัณฑ์เชื้อรา *C. globosum* ในรูปแบบของเหลวสูตรที่ 2 (เติมแร่ pumice)

F3 ชีวภัณฑ์เชื้อรา *C. globosum* ในรูปแบบของเหลวสูตรที่ 3 (เติมแร่ greencal)

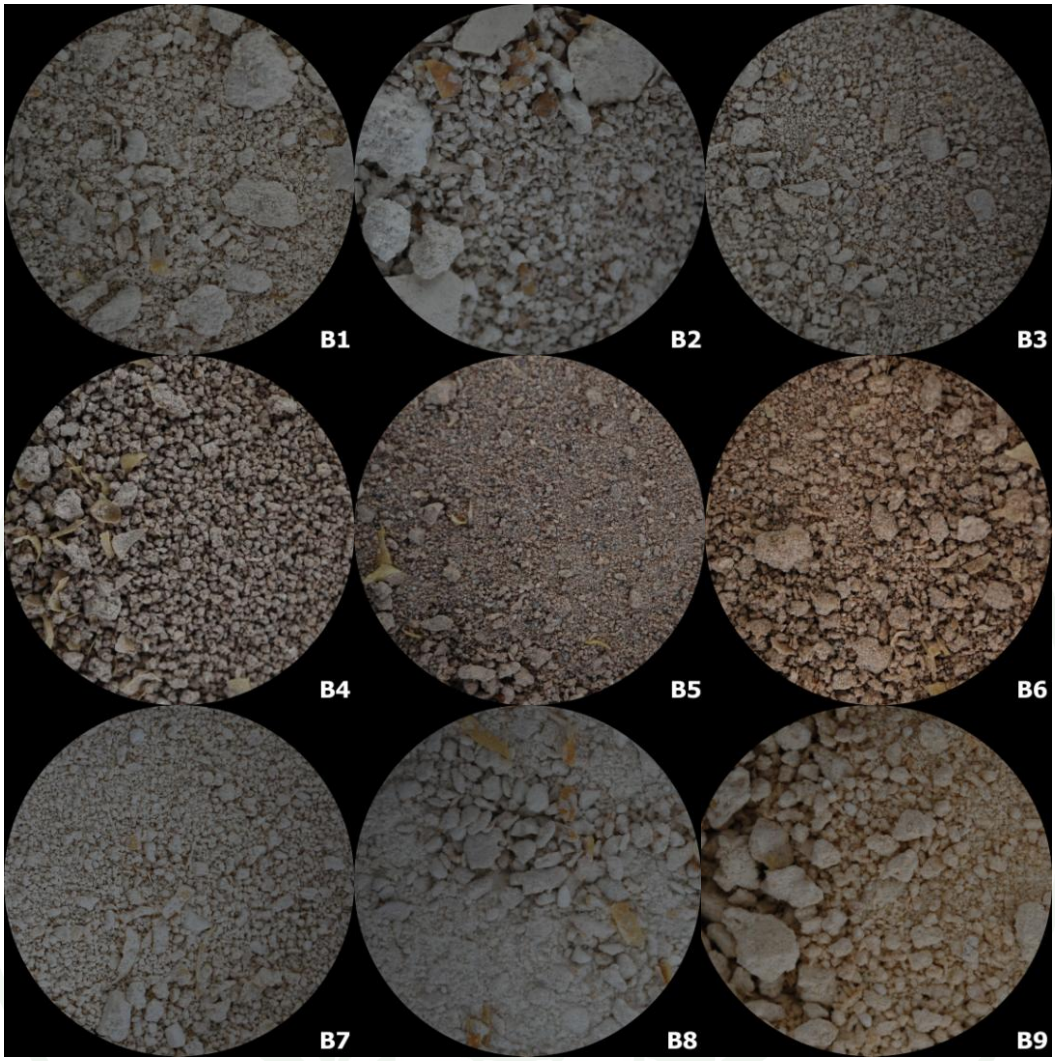
F4 ชีวภัณฑ์เชื้อรา *C. globosum* ในรูปแบบของเหลวสูตรที่ 4 (ไม่มีการเติมแร่)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 การศึกษาวิธีการผลิตชีวภัณฑ์เชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ในรูปแบบผงแห้ง

จากการนำเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ที่เจริญบนข้าวโพดบดที่ผ่านการปั่นละเอียดผสมกับสารพา ได้แก่ แร่ 3 ชนิด คือ talc, pumice และ greencal สารจับติด 2 ชนิด คือ carboxymethyl cellulose (CMC) และ glycerol ตามสูตรในตารางที่ 2 จะได้ผงชีวภัณฑ์ของเชื้อราชนิดละ 9 สูตร (ภาพที่ 11 และ 12) โดยลักษณะของผงชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ชนิดต่างๆ (ผงแห้งสูตรที่ 1, 4 และ 7) และผงชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ชนิดต่างๆ และมีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 2, 5 และ 8) จะมีเนื้อผงส่วนใหญ่ละเอียดมากกว่าชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ชนิดต่างๆและมีการเติม glycerol (ผงแห้งสูตรที่ 3, 6 และ 9) เนื่องจาก glycerol นั้นเป็นสารพาที่เป็นของเหลวซึ่งมีความหนืด ทำให้เมื่อเติมลงไปในเชื้อราที่ผสมกับแร่ จะมีการจับตัวเป็นก้อนมากกว่าการเติม CMC ซึ่งมีลักษณะเป็นผง นอกจากนี้ยังพบว่า ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมกับแร่ greencal หากมีการจับตัวเป็นก้อนจะมีความแข็งมากกว่าชีว-ภัณฑ์ที่มีการเติมแร่ชนิดอื่นๆ ซึ่งอาจส่งผลต่อการตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อราได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 ลักษณะของชีวภัณฑ์เชื้อรา *Beauveria bassiana* ในรูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตร

B1 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* สูตรที่ 1 เชื้อรา + talc

B2 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* สูตรที่ 2 เชื้อรา + talc + CMC

B3 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* สูตรที่ 3 เชื้อรา + talc + glycerol

B4 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* สูตรที่ 4 เชื้อรา + pumice

B5 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* สูตรที่ 5 เชื้อรา + pumice + CMC

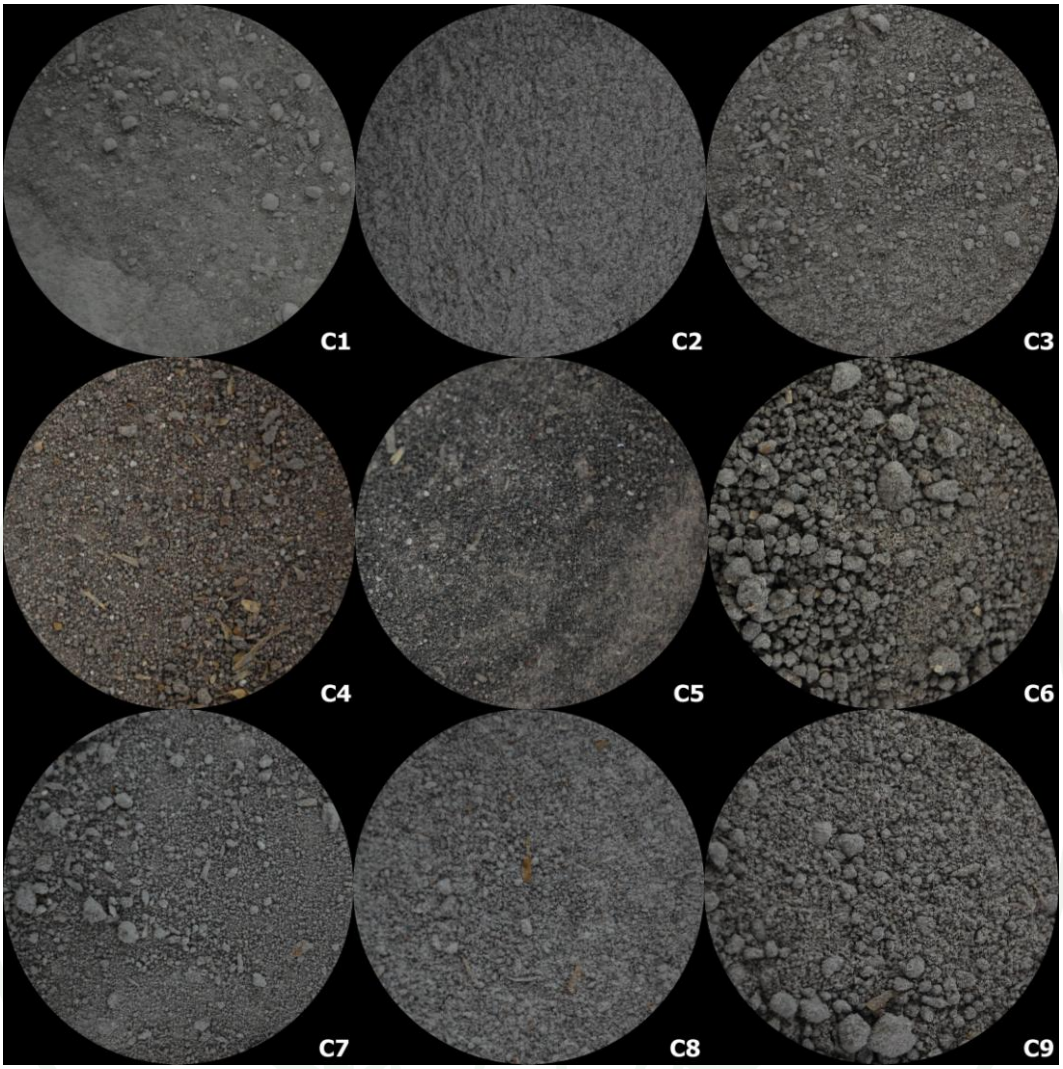
B6 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* สูตรที่ 6 เชื้อรา + pumice + glycerol

B7 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* สูตรที่ 7 เชื้อรา + greencal

B8 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* สูตรที่ 8 เชื้อรา + greencal + CMC

B9 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* สูตรที่ 9 เชื้อรา + greencal + glycerol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 12 ลักษณะของชีวภัณฑ์เชื้อรา *Chaetomium globosum* ในรูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตร

C1 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *C. globosum* สูตรที่ 1 เชื้อรา + talc

C2 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *C. globosum* สูตรที่ 2 เชื้อรา + talc + CMC

C3 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *C. globosum* สูตรที่ 3 เชื้อรา + talc + glycerol

C4 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *C. globosum* สูตรที่ 4 เชื้อรา + pumice

C5 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *C. globosum* สูตรที่ 5 เชื้อรา + pumice + CMC

C6 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *C. globosum* สูตรที่ 6 เชื้อรา + pumice + glycerol

C7 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *C. globosum* สูตรที่ 7 เชื้อรา + greencal

C8 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *C. globosum* สูตรที่ 8 เชื้อรา + greencal + CMC

C9 ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *C. globosum* สูตรที่ 9 เชื้อรา + greencal + glycerol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2.1 การศึกษาคุณสมบัติการแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* รูปแบบผงแห้ง

จากการนำผงชีวภัณฑ์เชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ทั้ง 9 สูตร ปริมาณสูตรละ 1.5 กรัม ใส่ลงในน้ำปริมาตร 60 มิลลิลิตร ไม่ต้องเขย่า จากนั้นสังเกตการแตกตัวของผงชีวภัณฑ์เชื้อราในน้ำภายในระยะเวลา 5 นาที พบว่า ผงชีวภัณฑ์เชื้อราแต่ละสูตรจะมีลักษณะการละลายแตกต่างกัน (ภาพที่ 13 และ 14) โดยผงชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* สูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ pumice และ greencal และมีการเติม glycerol (ผงแห้งสูตรที่ 6 และ 9 ตามลำดับ) จะแตกตัวในน้ำได้ดีที่สุด สามารถแตกตัวได้หมดภายในระยะเวลา 5 นาที รองลงมาคือ สูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc และมีการเติม glycerol (ผงแห้งสูตรที่ 3) ผงชีวภัณฑ์สูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ pumice (ผงแห้งสูตรที่ 4) ผงชีวภัณฑ์สูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ pumice และมีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 5) และผงชีวภัณฑ์สูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal (ผงแห้งสูตรที่ 7) สามารถแตกตัวน้ำได้เกือบหมดภายในระยะเวลา 5 นาที และผงชีวภัณฑ์สูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc (ผงแห้งสูตรที่ 1) ผงชีวภัณฑ์เชื้อสูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc และมีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 2) และ ผงชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal และมีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 8) จะสามารถละลายน้ำได้น้อยที่สุดภายในระยะเวลา 5 นาที (ตารางที่ 11)

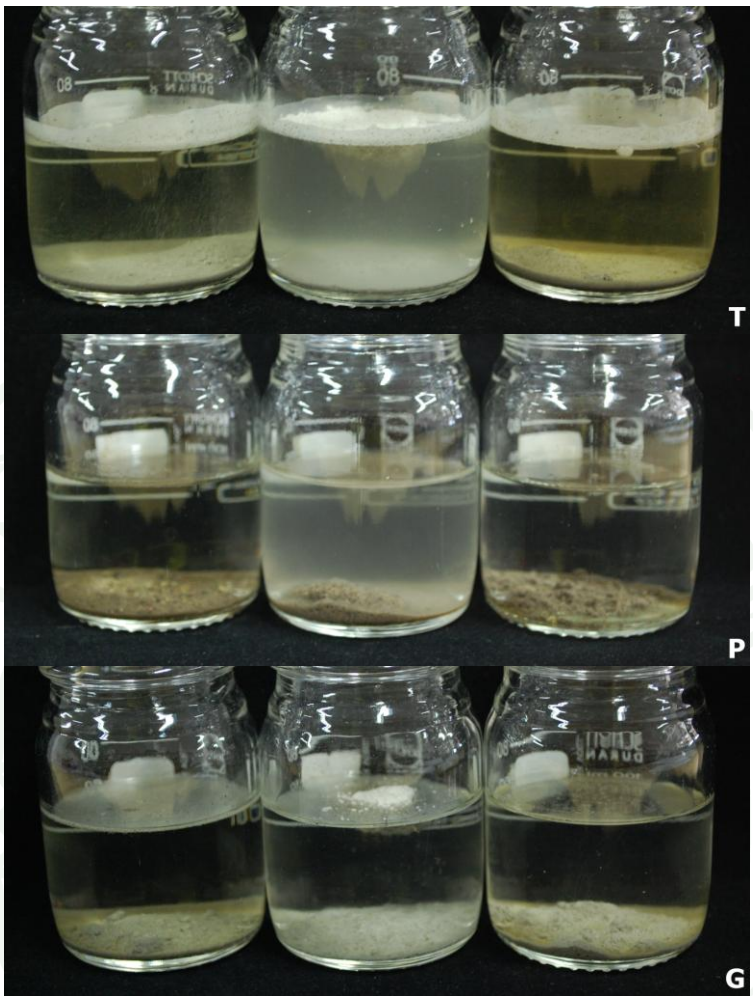
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ผงชีวภัณฑ์เชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* สูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ pumice หรือมีการเติม glycerol มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี อาจเนื่องมาจากอนุภาคของแร่ pumice มีลักษณะเป็นรูพรุนถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Wikipedia, 2014) เมื่อผสมกับเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ที่เจริญบนข้าวโพดบดที่ผ่านการปั่นละเอียด อนุภาคของผงเชื้อราจะสามารถเข้าไปแทรกอยู่ตามรูพรุนนั้น ทำให้แร่ pumice มีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้น ส่วน glycerol นั้นเป็นสารพาที่เป็นของเหลวที่มีความหนืด นอกจากจะทำหน้าที่เป็นสารจับติดแล้วยังช่วยเก็บรักษาความชุ่มชื้นอีกด้วย ทำให้ผงชีวภัณฑ์เชื้อราที่มีการเติม glycerol จะมีน้ำหนักมากกว่าผงชีวภัณฑ์เชื้อราที่ไม่มีการเติม glycerol จึงส่งผลให้ผงชีวภัณฑ์เชื้อราที่มีการเติม glycerol สามารถละลายน้ำได้ดีกว่าผงชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรอื่นๆ (Wikipedia, 2014)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 ความสามารถในการแตกตัวในน้ำของผงชีวภัณฑ์เชื้อราทั้ง 9 สูตร ภายในเวลา 5 นาที

สูตรของชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้ง	ความสามารถในการแตกตัวในน้ำภายในเวลา 5 นาที
สูตรที่ 1 เชื้อรา + talc	แตกตัวได้น้อย
สูตรที่ 2 เชื้อรา + talc + CMC	แตกตัวได้น้อย
สูตรที่ 3 เชื้อรา + talc + glycerol	แตกตัวได้ดี
สูตรที่ 4 เชื้อรา + pumice	แตกตัวได้ดี
สูตรที่ 5 เชื้อรา + pumice + CMC	แตกตัวได้ดี
สูตรที่ 6 เชื้อรา + pumice + glycerol	แตกตัวได้ดีมาก
สูตรที่ 7 เชื้อรา + greencal	แตกตัวได้ดี
สูตรที่ 8 เชื้อรา + greencal + CMC	แตกตัวได้น้อย
สูตรที่ 9 เชื้อรา + greencal + glycerol	แตกตัวได้ดีมาก

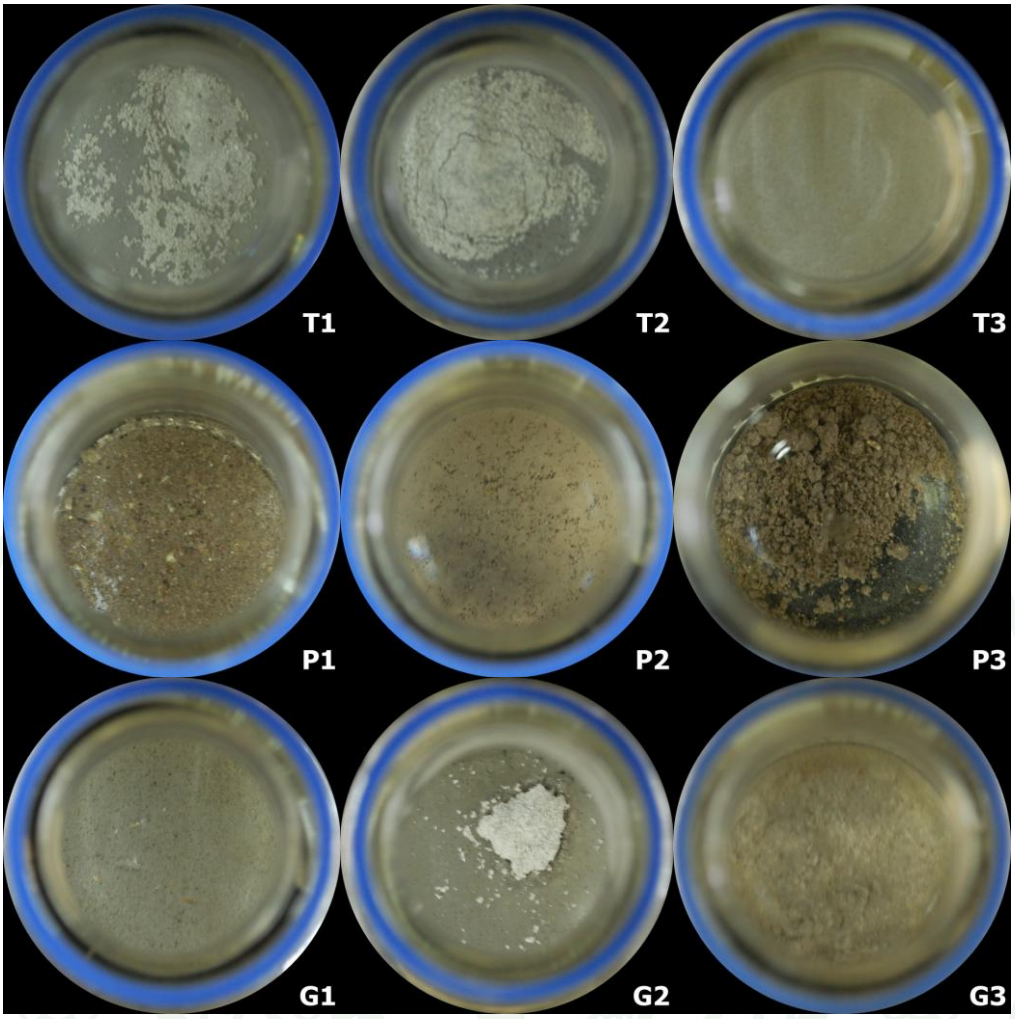
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



เชื้อรา + แร่ **เชื้อรา + แร่ + CMC** **เชื้อรา + แร่ + glycerol**

ภาพที่ 13 ลักษณะการแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตรในน้ำ นาน 5 นาที
T การแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบผงแห้งที่มีการผสมแร่ talc
P การแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบผงแห้งที่มีการผสมแร่ pumice
G การแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบผงแห้งที่มีการผสมแร่ greencal

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 ลักษณะการแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตรในน้ำ นาน 5 นาที

T1 การแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรที่ 1 เชื้อรา + talc

T2 การแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรที่ 2 เชื้อรา + talc + CMC

T3 การแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรที่ 3 เชื้อรา + talc + glycerol

P1 การแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรที่ 4 เชื้อรา + pumice

P2 การแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรที่ 5 เชื้อรา + pumice + CMC

P3 การแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรที่ 6 เชื้อรา + pumice + glycerol

G1 การแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรที่ 7 เชื้อรา + greencal

G2 การแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรที่ 8 เชื้อรา + greencal + CMC

G3 การแตกตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรที่ 9 เชื้อรา + greencal + glycerol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2.2 การศึกษาความมีชีวิตของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้ง

จากการนำผงชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ที่มีอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 9, 20, 40, 60, 90 และ 180 วัน ปริมาณสูตรละ 5 กรัม เจือจางลงในน้ำที่ผสม 0.05% tween 80 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางโดยทำ serial dilution แล้วทำการ spread plate บนอาหาร PDA ผลการนับความมีชีวิตของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ในผงชีวภัณฑ์ที่ได้เตรียมขึ้น พบว่า ที่ระยะเวลา 9 วัน จะมีปริมาณเชื้อราทั้งสองชนิดในแต่ละสูตรไม่เท่ากัน (ภาพที่ 15 และ ภาพที่ 16) โดยพบว่า ภายหลังการผสมชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งแล้ว 9 วัน ชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal และมีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 8) จะมีปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* มากที่สุด มีค่าเท่ากับ 97500×10^4 โคโลนีต่อกรัม รองลงมาได้แก่ ปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* ในผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc และมีการเติม glycerol (ผงแห้งสูตรที่ 3) และ ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc และมีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 2) มีค่าเท่ากับ 78400×10^4 และ 47425×10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ เมื่ออายุของชีวภัณฑ์อยู่ที่ระยะเวลา 20 วัน ปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งทุกสูตรมีแนวโน้มลดลง ยกเว้นปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* ในผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ pumice (ผงแห้งสูตรที่ 4) และ ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal (ผงแห้งสูตรที่ 7) ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 70550×10^4 และ 10577×10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ ต่อจากนั้นที่ระยะเวลา 40วัน ปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งทุกสูตรมีแนวโน้มลดลงเช่นเดิม ยกเว้นปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* ในผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc (ผงแห้งสูตรที่ 1) และผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc และมีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 2) ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 49250×10^4 และ 29900×10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นพบว่า ปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งทุกสูตรมีแนวโน้มลดลงและเมื่อเก็บรักษาผงชีวภัณฑ์ไปจนถึง 90 วัน โดยพบปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งเพียง 3 สูตร คือ ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc (ผงแห้งสูตรที่ 1) ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal (ผงแห้งสูตรที่ 7) และ ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal และมีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 8) มีค่าเท่ากับ 120×10^4, 16400×10^4 และ 435×10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ และสุดท้ายที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 180 วัน พบปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งเพียง 2 สูตร คือ ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc (ผงแห้งสูตรที่ 1) และ ผงชีวภัณฑ์ที่มี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การผสมเชื้อรากับแร่ greencal และมีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 8) มีค่าเท่ากับ 12.50×10^4 และ 51.00×10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 1)

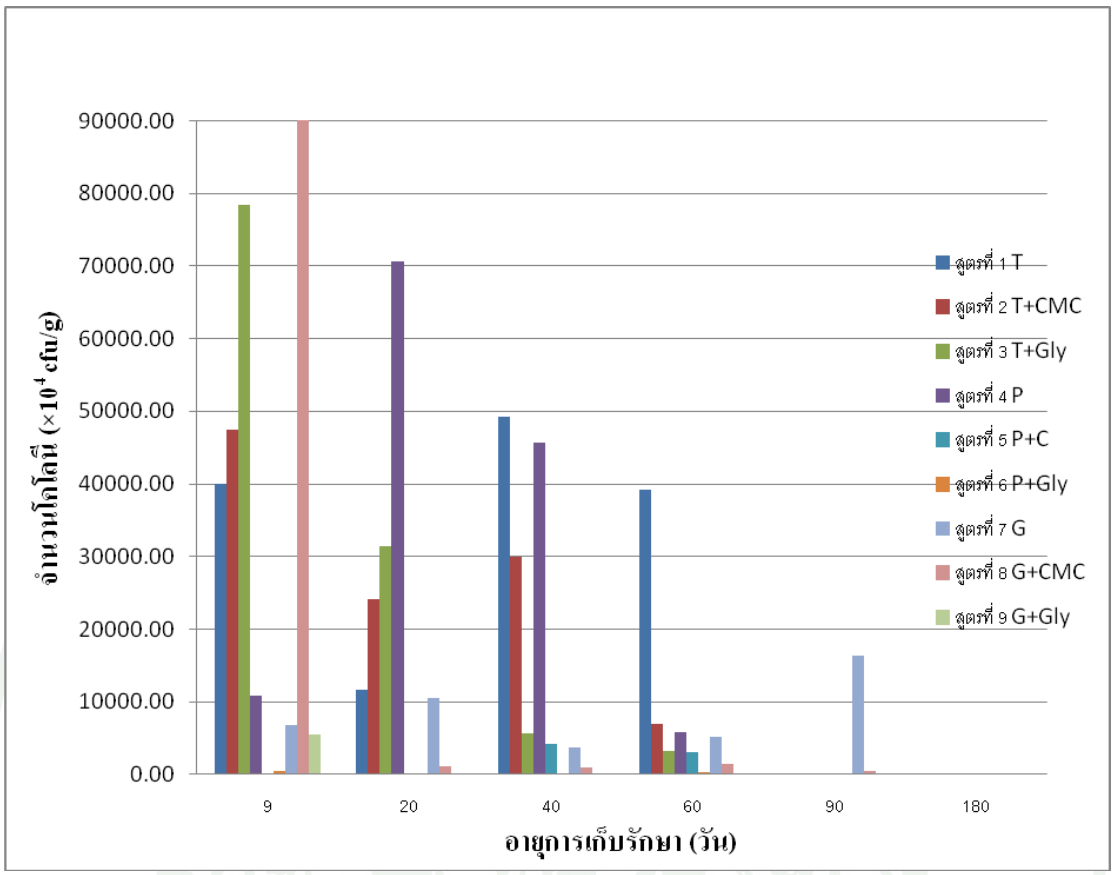
ส่วนปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งที่ระยะเวลาเก็บรักษา 9 วัน พบว่า ปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal และมีการเติม glycerol (ผงแห้งสูตรที่ 9) จะมีปริมาณมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 60.75×10^5 โคโลนีต่อกรัม รองลงมาได้แก่ ปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ในผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc และมีการเติม glycerol (ผงแห้งสูตรที่ 3) และ ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal (ผงแห้งสูตรที่ 7) มีค่าเท่ากับ 41.75×10^5 และ 19.50×10^5 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาผงชีวภัณฑ์ไป 20 วัน ปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งส่วนใหญ่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยผงชีวภัณฑ์สูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal และมีการเติม glycerol (ผงแห้งสูตรที่ 9), ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ pumice ที่มีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 5) และผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc และมีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 2) จะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเป็น 3 อันดับแรก มีค่าเท่ากับ 87.75×10^5, 80.75×10^5 และ 77.75×10^5 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ ที่ระยะเวลาเก็บรักษา 40 วัน ปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งส่วนใหญ่มีแนวโน้มลดลง ยกเว้น ผงชีวภัณฑ์ของเชื้อราที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ pumice ที่มีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 5) ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc และมีการเติม glycerol (ผงแห้งสูตรที่ 3), ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ pumice (ผงแห้งสูตรที่ 4) และ ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal และมีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 8) จะมีค่าเพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 88.70×10^5, 50.00×10^5, 14.10×10^5 และ 12.10×10^5 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ ต่อมาที่ระยะเวลาเก็บรักษา 60 วัน ปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งส่วนใหญ่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยผงชีวภัณฑ์ของเชื้อราที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal และมีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 8), ผงชีวภัณฑ์ของเชื้อราสูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal และมีการเติม glycerol (ผงแห้งสูตรที่ 9) และ ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ pumice และมีการเติม glycerol (ผงแห้งสูตรที่ 6) จะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเป็น 3 อันดับแรก มีค่าเท่ากับ 42.68×10^5, 40.50×10^5และ 33.10×10^5 โคโลนีต่อกรัม หลังจากนั้นที่ระยะเวลาเก็บรักษา 90วัน ปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งส่วนใหญ่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ยกเว้นผงชีวภัณฑ์สูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc และมีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 2) ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal (ผงแห้งสูตรที่ 7) และ ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal และมีการเติม glycerol (ผงแห้งสูตรที่ 9) จะมีปริมาณลดลง และสุดท้ายที่ระยะเวลาเก็บรักษา 180 วัน ปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งส่วนใหญ่มีแนวโน้มลดลง ยกเว้น ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc (ผงแห้งสูตรที่ 1), ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ pumice ที่มีการเติม CMC (ผงแห้งสูตรที่ 5) และ ผงชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ greencal (ผงแห้งสูตรที่ 7) จะมีค่าเพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 40.13×10^5, 34.58×10^5 และ 26.55×10^5 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 2)

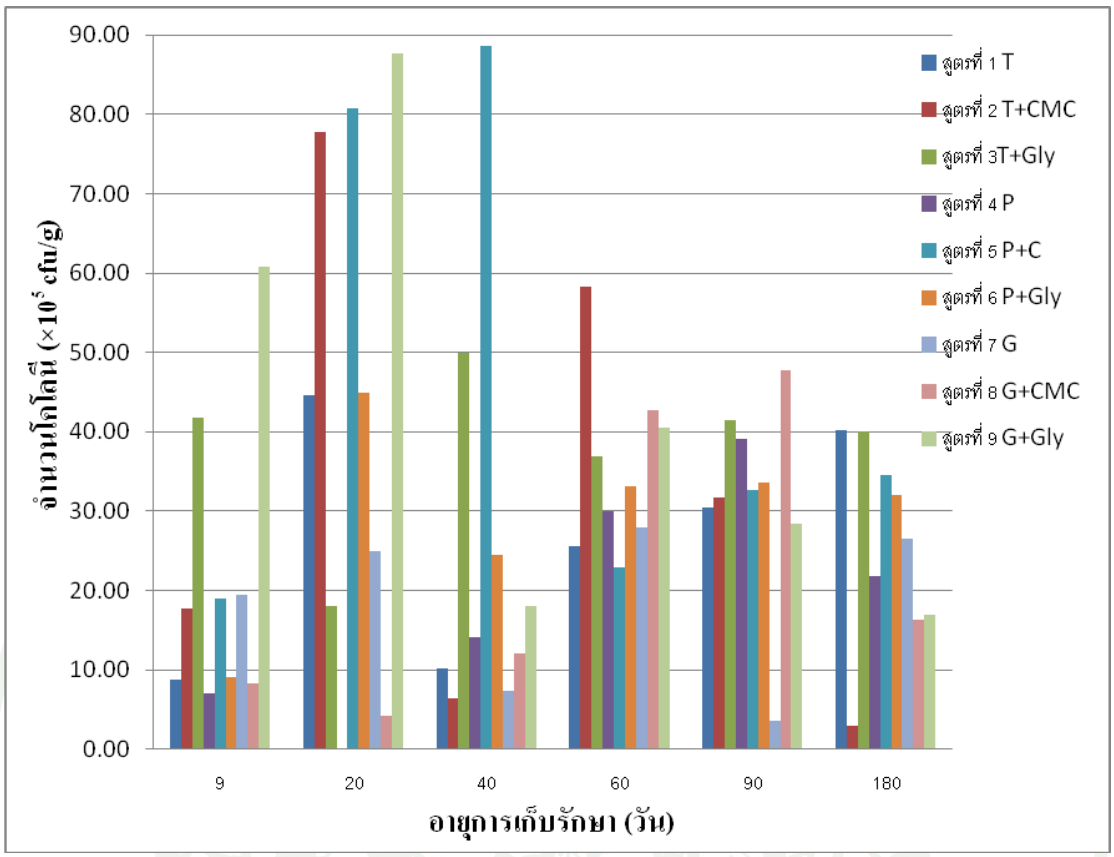
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* รูปแบบผงแห้งสูตรที่มีการผสมเชื้อรากับแร่ talc มีแนวโน้มในการรักษาความมีชีวิตของเชื้อราทั้งสองได้ดี ซึ่งตรงกับรายงานของ Vidhyasekaran and Muthamilan (1995) ที่ทำการพัฒนาสารชีวภัณฑ์ชนิดผงแห้งของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* พบว่า สารชีวภัณฑ์ที่มี talc และ peat เป็นส่วนประกอบสามารถเก็บรักษาความมีชีวิตของเชื้อ *P. fluorescens* ได้นานถึง 240 วันแม้ว่าจะเริ่มมีการตายหลังจากการเก็บรักษาเชื้อเป็นเวลา 30 วัน และ รายงานของ Haggag and Singer (2012) ที่ทำการพัฒนาชีวภัณฑ์ชนิดผงของเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด พบว่า ชีวภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของ talc, kaolin และ glycerol สามารถรักษาความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียได้นาน 60 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9, 20, 40, 60, 90 และ 180 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9, 20, 40, 60, 90 และ 180 วัน

3.3 การศึกษาวิธีการผลิตชีวภัณฑ์เชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ในรูปแบบเม็ด

3.3.1 การศึกษาชนิดของสารจับติด (binder) ที่เหมาะสมในการผลิตชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ด

จากการนำสารจับติด 4 ชนิด ได้แก่ polyvinyl pyrrolidone K30 (PVP K30), xanthan gum, chitosan และ glycerol มาใส่ลงในเชื้อราที่เจริญบนข้าวโพดบดที่ผ่านการปั่นละเอียด ผสมกับแร่ talc แล้วนำมาตอกเป็นเม็ด จากนั้นนำมาใส่ลงในน้ำเพื่อสังเกตการแตกกระจายตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบเม็ดภายในระยะเวลา 5 นาที พบว่า ชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบเม็ดที่ผสมสารจับติดแต่ละชนิดมีความสามารถในการแตกกระจายตัวแตกต่างกัน (ตารางที่ 12) ดังนี้ ชีวภัณฑ์

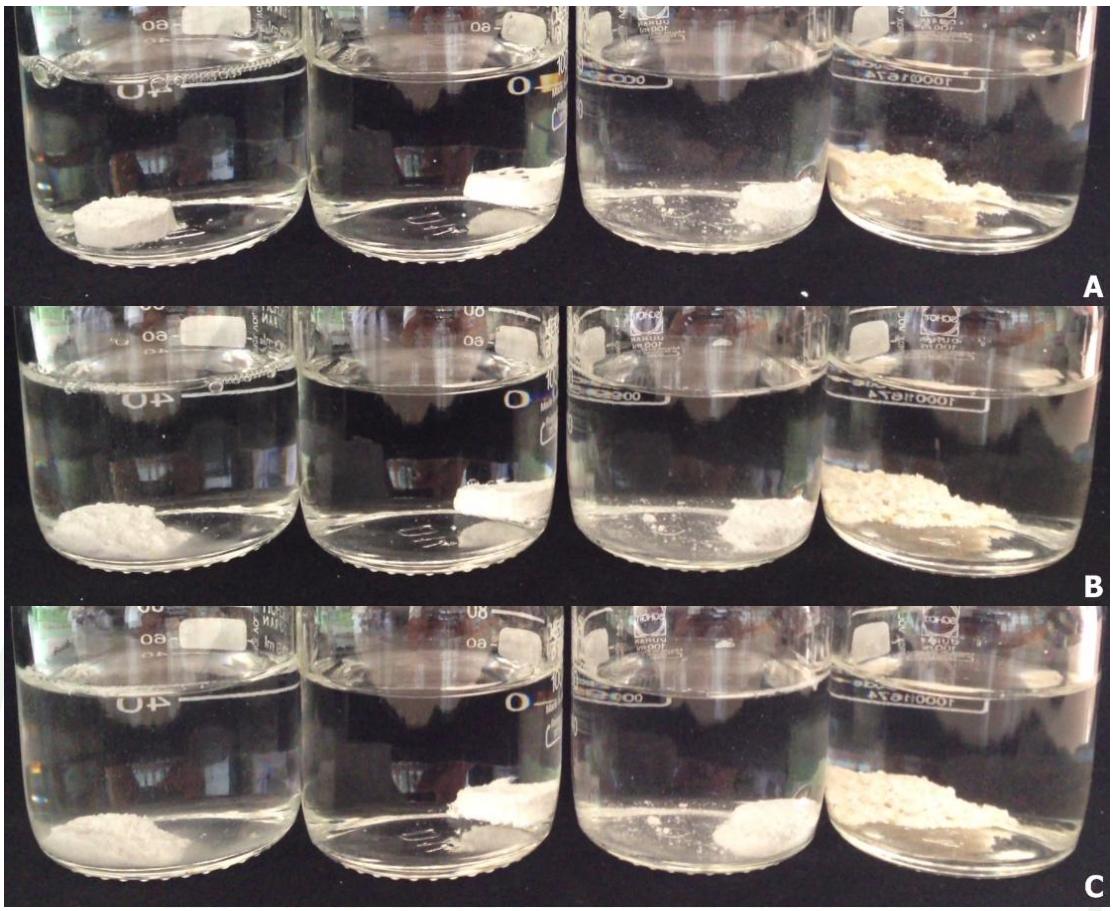
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื้อราในรูปแบบเม็ดที่ใช้ PVP K30 (สูตรที่ 1) และ chitosan (สูตรที่ 3) เป็นสารจับติดมีการแตกกระจายตัวได้ดีที่สุด โดยสามารถแตกตัวได้อย่างรวดเร็วภายภายในระยะเวลา 1 นาที รองลงมา คือ ชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบเม็ดที่ใช้ glycerol (สูตรที่ 4) เป็นสารจับติดมีการแตกกระจายตัวได้เล็กน้อยเมื่อครบเวลา 5 นาที และชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบเม็ดที่ใช้ xanthan gum (สูตรที่ 2) เป็นสารจับติดไม่มีการแตกกระจายตัวเมื่อครบเวลา 5 นาที (ภาพที่ 17)

ตารางที่ 12 ผลของสารจับติดแต่ละชนิดต่อความสามารถในการแตกกระจายตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบเม็ดในน้ำภายในระยะเวลา 5 นาที

ชนิดของสารจับติด	ความสามารถในการแตกกระจายตัวในน้ำภายใน 5 นาที
PVP K30	แตกกระจายตัวได้ดีมาก
xanthan gum	ไม่มีการแตกกระจายตัว
chitosan	แตกกระจายตัวได้ดีมาก
glycerol	แตกกระจายตัวได้เล็กน้อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 17 ลักษณะการแตกกระจายตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบเม็ดที่ผสมสารจับติดแต่ละชนิดในน้ำ ที่ระยะเวลา 0, 1 และ 5 นาที

A การแตกกระจายตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบเม็ดที่ผสมสารจับติดแต่ละชนิดในน้ำ ที่ระยะเวลา 0 นาที

B การแตกกระจายตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบเม็ดที่ผสมสารจับติดแต่ละชนิดในน้ำ ที่ระยะเวลา 1 นาที

C การแตกกระจายตัวของชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบเม็ดที่ผสมสารจับติดแต่ละชนิดในน้ำ ที่ระยะเวลา 5 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารจับติดต่อการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* โดยวิธี poisoned food

จากการนำองค์ประกอบของสารจับติดจากรูปแบบของเม็ดชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 และ 3 ซึ่งมี polyvinyl pyrrolidone K30 (PVP K30) และ chitosan มาผสมลงในอาหาร WA จากนั้นวางเส้นใยของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ที่เตรียมไว้ตามข้อ 1.1 ลงบนอาหารแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง near UV และ cool white fluorescent นาน 14 วัน พบว่า สารจับติดที่ใช้ทดสอบ คือ PVP K30 และ chitosan ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* (ตารางที่ 13) โดยอาหาร WA ที่มีการเติมชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบเม็ดที่ผสม PVP K30 (สูตรที่ 1) และ chitosan (สูตรที่ 3) จะมีการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดได้ดีกว่าอาหาร WA ปกติ ซึ่งเชื้อรา *B. bassiana* สามารถเจริญบนอาหาร WA ที่มีการเติมชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบเม็ดที่ผสม PVP K30 (สูตรที่ 1) และ chitosan (สูตรที่ 3) ได้เท่ากับ 45.38 และ 43.56 มิลลิเมตร ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เท่ากับ -15.06 และ -10.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเชื้อรา *C. globosum* สามารถเจริญบนอาหาร WA ที่มีการเติมชีวภัณฑ์เชื้อราในรูปแบบเม็ดที่ผสม PVP K30 (สูตรที่ 1) และ chitosan (สูตรที่ 3) ได้เท่ากับ 45.56 และ 47.75 มิลลิเมตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เท่ากับ -12.49 และ -17.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่บนอาหาร WA ปกติ พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* สามารถเจริญได้เพียง 39.44 มิลลิเมตร และเชื้อรา *C. globosum* สามารถเจริญได้เพียง 40.50 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าสารจับติดที่ใช้ไม่มีอันตรายต่อการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 ผลของสารจับติดที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 14 วัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	*B. bassiana*		*C. globosum*	
	ขนาดโคโลนีของเชื้อรา[1/]	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา	ขนาดโคโลนีของเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา
WA + PVP K 30	45.38a	-15.06	45.56a	-12.49
WA + chitosan	43.56a	-10.45	47.75a	-17.90
WA	39.44b	0.00	40.50b	0.00
C.V. %	4.10		7.03	

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้วิธี Least significant difference (LSD) (P= 0.05)

3.3.3 การศึกษาความมีชีวิตของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ด

ทดสอบเม็ดชีวภัณฑ์เชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* สูตรที่ 1 และ 1+ ซึ่งผสมสารจับติดที่ผ่านการคัดเลือก คือ polyvinyl pyrrolidone K30 (PVP K30) เนื่องจากในการทดสอบความเป็นพิษต่อการเจริญของเชื้อรา พบว่า ไม่มีผลต่อเชื้อราทั้งสองชนิดและความหนืดของสาร PVP K 30 มีมากกว่า chitosan ทำให้เพิ่มโอกาสในการจับให้เป็นเม็ด ไม่เกิดการแตก และสปอร์ของเชื้อราทั้งสองชนิดไม่สูญหายไป นำเม็ดชีวภัณฑ์เชื้อราที่มีอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 10, 20 และ 30 วัน นำมาตัวอย่างอย่างละ 1 เม็ด เจือจางลงในน้ำที่ผสม 0.05% tween 80 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร ทำ serial dilution และ spread plate บนอาหาร PDA ผลการตรวจนับปริมาณเชื้อที่พบ พบว่า ที่ระยะเวลาเริ่มต้น เม็ดชีวภัณฑ์เชื้อรา *B. bassiana* ที่มีการผสม PVP K30 (สูตรที่ 1) และเม็ดชีวภัณฑ์เชื้อรา *B. bassiana* ที่มีการเพิ่มปริมาณเชื้อราผสมกับ PVP K30 (สูตรที่ 1+) (ภาพที่ 18) มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10.85×10^6 และ 30.23×10^6 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นจนถึงระยะเวลา 30 วัน ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* ในรูปแบบเม็ดทุกสูตรจะมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยเม็ดชีวภัณฑ์เชื้อรา *B. bassiana* ที่มีการผสม PVP K30 (สูตรที่ 1)

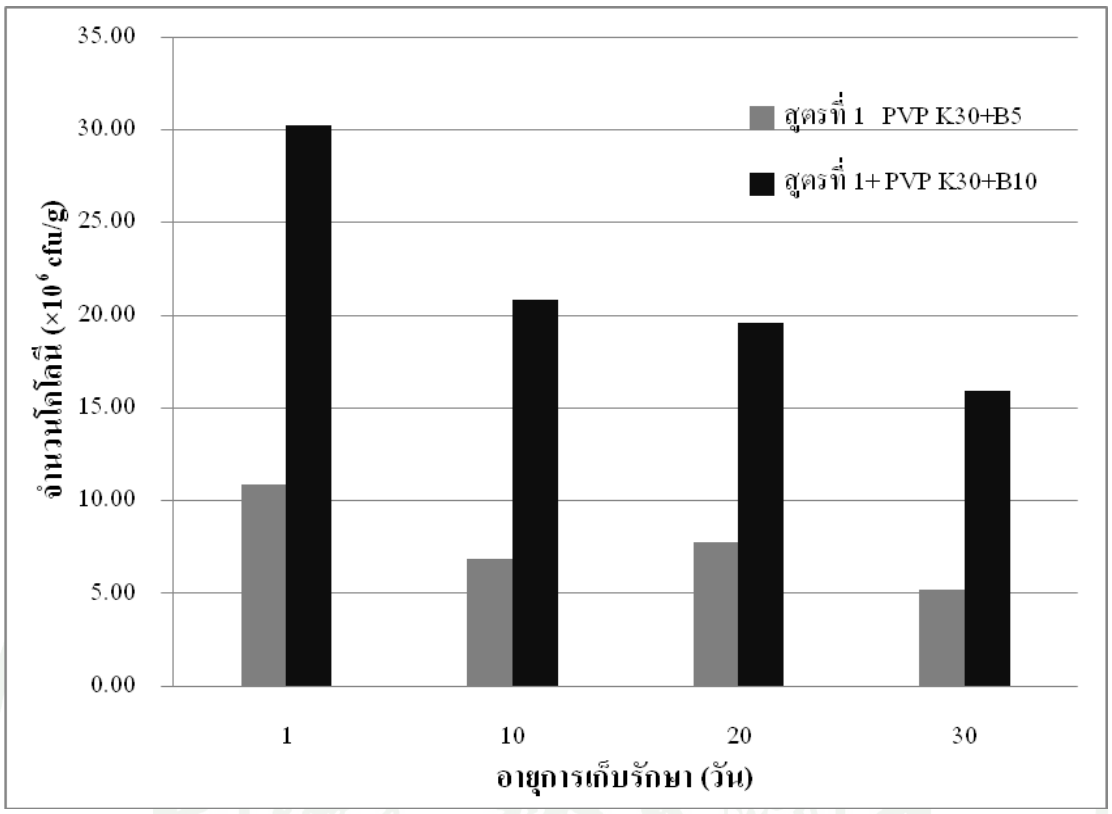
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และเม็ดชีวภัณฑ์เชื้อรา *B. bassiana* ที่มีการเพิ่มปริมาณเชื้อราผสมกับ PVP K30 (สูตรที่ 1+) มีการลดลงของปริมาณเชื้อราเท่ากับ 5.19×10^6 และ 15.90×10^6 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 3)

ส่วนความมีชีวิตของเชื้อรา *C. globosum* ในชีวภัณฑ์เชื้อรารูปแบบเม็ด พบว่าที่ระยะเวลาเริ่มต้น จะพบว่า ปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ในเม็ดชีวภัณฑ์เชื้อราที่มีการผสม PVP K30 (สูตรที่ 1) และเม็ดชีวภัณฑ์เชื้อราสูตรที่มีการเพิ่มปริมาณเชื้อราผสมกับ PVP K30 (สูตรที่ 1+) มีค่าเท่ากับ 2.88×10^4 และ 4.82×10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 19) ต่อมาเมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลา 10 วัน ปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ในชีวภัณฑ์เชื้อรารูปแบบเม็ดทุกสูตรจะเพิ่มขึ้น มีปริมาณเท่ากับ 3.30×10^4 และ 8.07×10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ในชีวภัณฑ์เชื้อรารูปแบบเม็ดทุกสูตรจะลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงระยะเวลา 30 วัน พบว่า ปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ในเม็ดชีวภัณฑ์เชื้อราที่มีการผสม PVP K30 (สูตรที่ 1) และเม็ดชีวภัณฑ์เชื้อราที่มีการเพิ่มปริมาณเชื้อราผสมกับ PVP K30 (สูตรที่ 1+) จะมีปริมาณลดลงเท่ากับ 1.88×10^4 และ 2.24×10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 4)

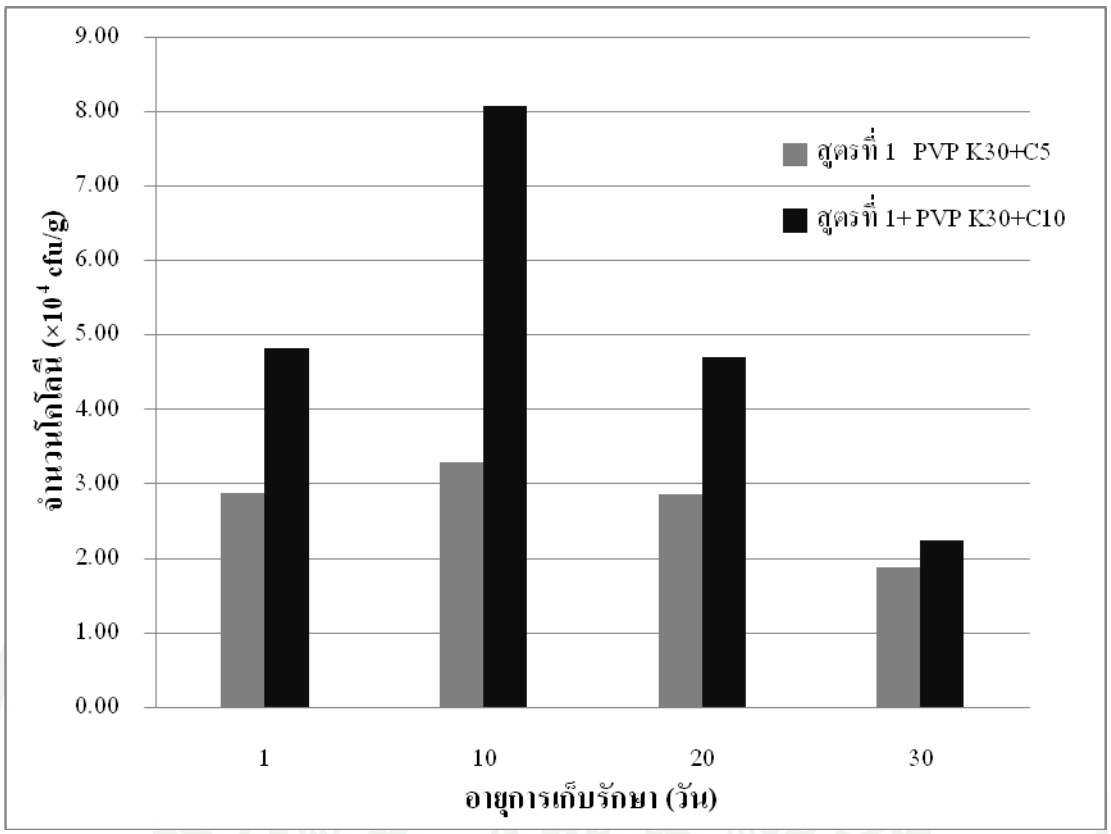
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ชีวภัณฑ์เชื้อราทั้งสองชนิดในรูปแบบเม็ดสูตรที่ 1 และสูตรที่ 1+ ที่มีการเพิ่มปริมาณเชื้อราซึ่งมีส่วนผสมของ PVP K30 มีแนวโน้มในการเก็บรักษาเชื้อราทั้งสองชนิดได้ภายในระยะเวลา 30 วัน เนื่องจากสาร PVP มีความหนืด ทำให้เมื่อนำมาตอกเป็นเม็ดการจับตัวของสปอร์เชื้อราจะจับตัวกันได้ดีและยังช่วยเก็บรักษาความชุ่มชื้นของเซลล์เชื้อราอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มปริมาณเชื้อราที่ใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ดในการทดลองนี้มีแนวโน้มในการลดความมีชีวิตของเชื้อราทั้งสองชนิด เนื่องจาก ธาตุอาหารที่มีในเม็ดชีวภัณฑ์ของเชื้อรามีปริมาณจำกัดซึ่งอาจจะไม่เพียงพอต่อปริมาณของเชื้อราที่มีมาก และเชื้อราอาจมีการสร้างสารทุติยภูมิบางอย่างออกมา ทำให้การลดปริมาณของเชื้อราเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 18 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ในชีวภัณฑ์เชื้อรารูปแบบเม็ดทั้ง 4 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1, 10, 20 และ 30 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 19 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ดทั้ง 4 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1, 10, 20 และ 30 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* เพื่อใช้ในการเตรียมเป็นสารสำคัญสำหรับผลิตสารชีวภัณฑ์นั้น พบว่า ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา ค่า pH และแหล่งของคาร์บอนหรือไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อรา มีอิทธิพลต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราแต่ละชนิดแตกต่างกัน พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร PDA และ PDA ที่มีการเติม chitosan มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเท่ากับ 9.0 และอาหารที่มีส่วนประกอบของ fructose หรือ KNO_3 จะช่วยในการเจริญและการกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา ส่วนเชื้อรา *C. globosum* จะเจริญได้ดีบนอาหาร YPA และ PDA ที่มีการเติม 0.2% chitosan โดยมีค่า pH ที่เหมาะสมคือ 5.5-6.0 และอาหารที่มี cellulose เป็นส่วนประกอบจะช่วยในการเจริญและการกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา

การทดสอบการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* บนวัสดุธรรมชาติโดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง นาน 28 วัน พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* จะเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุดบนข้าว รองลงมาคือ ข้าวโพด ที่ระยะเวลา 21 วัน แต่การเลี้ยงในข้าวโพดจะสามารถเก็บรักษาได้นานกว่าการเลี้ยงในข้าว ส่วนเชื้อรา *C. globosum* จะเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุดบนข้าวโพด ที่ระยะเวลา 21 วัน และการเติมแหล่งของคาร์บอนหรือไนโตรเจนที่เหมาะสมในวัสดุธรรมชาติเพื่อกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของเชื้อราพบว่า ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* แต่จะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *C. globosum* ในช่วง 14 วันแรกของการเลี้ยงเชื้อรา

การศึกษาวิธีการผลิตชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* เพื่อใช้ในการเก็บรักษาความมีชีวิตเชื้อรา พบว่า ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ในรูปแบบผงแห้งสูตรที่มีการใช้แร่ talc เป็นสารพาผสมกับเชื้อราที่เจริญบนข้าวโพดบดซึ่งผ่านการปั่นละเอียดมีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษาความมีชีวิตของเชื้อราทั้งสองชนิด และเมื่อนำสูตรดังกล่าวมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ด เพื่อให้เกิดความสะดวกในการใช้ประโยชน์มากยิ่งขึ้น พบว่า การใช้ chitosan และ PVP K30 เป็นสารจับติดในการตอกเป็นเม็ดมีความเหมาะสมมากที่สุดในการทดลองนี้ ส่วนการเก็บรักษาความมีชีวิตของเชื้อราภายในระยะเวลา 30 วัน พบว่า การใช้ PVP K30 เป็นสารจับติดมีแนวโน้มในการเก็บรักษาความมีชีวิตของเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. globosum* ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในการทดลองนี้จะพบปัญหาในการผลิตและการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ของเชื้อราในรูปแบบของเหลว เนื่องจากอัตราส่วนหรือส่วนผสมที่ใช้ในการผลิตที่ไม่เหมาะสมจึงทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเน่าเสียและมีการงอกของเส้นใยเชื้อราบนผิวอาหาร นอกจากนี้ในการผลิตชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *B. bassiana* ในรูปแบบผงแห้ง จะมีปัญหาในการจับตัวเป็นก้อนของผลิตภัณฑ์ทำให้บางครั้งเกิดปัญหาในการตรวจสอบปริมาณของเชื้อรา ดังนั้นควรจะมีการพัฒนาส่วนผสมหรืออัตราส่วนที่ใช้ในชีวภัณฑ์แต่ละชนิดต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษณา พงษ์พานิช. 2534. การทดลองเพาะเลี้ยงและทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับแมลงของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. ว.วิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 8(2): 26-31.

เกษม สร้อยทอง. 2534. การใช้รา *Chaetomium globosum* ควบคุมโรคใบจุดของข้าวโพด. หน้า 269-275. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยวันที่ 4-7 กุมภาพันธ์ 2534

เกษม สร้อยทอง. 2535. การผลิตยาเชื้อสำหรับควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธี. หน้า 301-307. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย วันที่ 29 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2535 กรุงเทพฯ

จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรรณวิไล อินทนู. 2542. การพัฒนาการผลิตหัวเชื้อราไตรโคเดอร์มาเพื่อเกษตรกร. รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สถาบันวิจัยและพัฒนา แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2549. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2551. การเพิ่มผลผลิตและลดโรคข้าวด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มา. เคหการเกษตร. 32(7): 221-226.

นริศ ท้าวจันทร์ และ อนุชิต ชินาจริยวงศ์. 2551. ประสิทธิภาพการควบคุมของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในแมลงวันผลไม้ (Diptera: Tephritidae). ว.วิทยาศาสตร์เกษตร (พิเศษ) 39(3): 21-25.

ประสิทธิ์ วังภคพัฒนวงศ์. 2553. โภชนาการของข้าวและนวัตกรรมการใช้ประโยชน์. ว.คลินิกอาหารและโภชนาการ (วคอภ) 4 (1): 32-40.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพชรหทัย ปฏิรูปานุสร และ อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อราทำลายแมลงต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยจักจั่นสีเขียว. หน้า 144-154. ใน: การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2550 วันที่ 19-21 กุมภาพันธ์ 2550 จังหวัดปทุมธานี.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2551. ราวิทยา. ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

วิวัฒน์ เสือสะอาด, พิมพรรณ สมมาตย์, ปวีณา บูชาเทียน, อาภรณ์ ปั้นทองคำ และรัตติรส เชียงสิน. 2551. การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราขาว *Beuveria bassiana* ในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชเศรษฐกิจ. หน้า 161-168. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย วันที่ 29 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2551 กรุงเทพฯ.

วิวัฒน์ เสือสะอาด, พิมพรรณ สมมาตย์, ปวีณา บูชาเทียน, รัตติรส เชียงสิน และอาภรณ์ ปั้นทองคำ. 2554. วัสดุที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณโคนิเดียของเชื้อราขาว *Beauveria bassiana* (Balsmo) Vuillemin. หน้า 125-130. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย วันที่ 1-4 กุมภาพันธ์ 2554 กรุงเทพฯ.

สมบัติ รุจาคม, ภมร ปัตตาวะตัง และนลินี เจียงวรรธนะ. 2541. การควบคุมแมลงสิงโดยเชื้อราขาว *Beauveria bassiana* และเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae*. หน้า 198-209. ใน: การสัมมนาทางวิชาการ เรื่อง การพัฒนาข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ครั้งที่ 9 จังหวัดพิษณุโลก.

สุธาสินี แก้วกันดา และเกษม สร้อยทอง. 2544. การใช้ชีวผลิตภัณฑ์ของ *Chaetomium* spp. และ *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรครากเน่าและโรคแอนแทรคโนสของส้มเขียวหวาน. ว. วิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 18(2): 33-42.

สุมิตรา น้อยเอี่ยม. 2540. การควบคุมโรคแอนแทรคโนสมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ โดยชีววิธีแบบผสมผสาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อนุเทพ ภาสุระ. 2536. การผลิตมวลชีวภาพเชื้อรา *Trichodema harzianum* โดยกระบวนการหมักอาหารเหลวเพื่อใช้ในงานควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางชีววิธี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Barnes, G. L., D. J. Boethel, R. D. Eikenbary, J. T. Criswell and C. R. Gentry. 1975. Growth and sporulation of *Metarrhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. J. Inverteb. Pathol. 25: 301-305.

Basu, S. N. and R. G. Bose. 1950. Factors affecting the fruiting of *Chaetomium* species. J. Gen. Microbiol. 4(2): 132-140.

Bhat, K. A., Ali Anwar, G. M. Lone, K. Hussain and G. Nazir. 2009. Shelf life of liquid fermented product of *Trichoderma harzianum* in talc. J. Mycol. Pl. Pathol. 39(2):263-265.

Burges, H. D.1998. Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Academic, Great Britain. 412 pp.

Buston, H. W. and S. N. Basu. 1948. Some factors affecting the growth and sporulation of *Chaetomium globosum* and *Memnoniella echinata*. Journal of General Microbiology 2(2): 162-173.

Buston, H. W., M. O. Moss and D. Tyrrell. 1966. The influence of carbon dioxide on growth and sporulation of *Chaetomium globosum*. Tras. Br. Mycol. Soc. 49(2): 387-396.

Campbell, R. K., T. M. Perring, G. L. Barnes, R. D. Eikenbary and C. R. Gentry. 1978. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae* on media containing various amino acids. J. Inverteb. Pathol. 31: 289-295.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Connick, W. J., D. J. Daigle , A. B. Pepperman, K. P. Hebbar, R. D. Lumsden, T. W. Anderson and D. C. Sands. 1998. Preparation of stable, granular formulations containing *Fusarium oxysporum* pathogenic to narcotic plants. Biological Control 13: 79-84.

Daoust, R. A., M. G. Ward and D. W. Roberts. 1983. Effect of formulation on the viability of *Metarrhizium anisopliae* conidia. J. Inverteb. Pathol. 41: 151-160.

Davis, R. F., P. A. Backman, R. Rodriguez-Kabana and N. Kokalis-Burelle. 1992. Biological control of apple fruit diseases by *Chaetomium globosum* formulations containing cellulose. Biological Control 2: 118-123.

Feng, M. G., T. J. Poprawski and G. G. Khachatourians. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana for insect control: current status. Biocontrol Science and Technology 4: 3-34.

Fogle, M. R., D. R. Douglas, C. A. Jumper and D. C. Straus. 2007. Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum* . Mycopathologia 164: 49-56.

Fogle, M. R., D. R. Douglas, C. A. Jumper and D. C. Straus. 2008. Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum* is favored in a neutral pH. Int. J. Mol. Sci. 9: 2357-2365.

Freeman, S., D. Minz, I. Kolesnik, O. Barbul, A. Zveibil, M. Maymon, Y. Nitzani, B. Kirshner, D. Rav-David, A. Bilu, A. Dag, S. Shafir and Y. Elad. 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. European Journal of Plant Pathology 110: 361-370.

Gerding-González, M. A., A. France, M. E. Sepulveda and J. Campos. 2007. Use of chitin to improve a *Beauveria bassiana* alginate-pellet formulation. Biocontrol Science and Technology 17(1): 105-110.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Haggag, W. M. and S. Singer. 2012. Development and production of formulations of PGPR cells for control of leather fruit rot disease of strawberry. American Journal of Scientific Research 67: 16-22.

Hallsworth, E. J. and N. Magan. 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarrhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. J. Inverteb. Pathol. 74: 261-266.

Harris, A. R. 1999. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* on *Capsicum* by *Trichoderma koningii* in potting medium. Microbiol. Res. 154: 131-135.

Hegedus, D. D., M. J. Bidochka and G. G. Khachatourians. 1990. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 641-647.

Henis, Y. 1984. Interactions between *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma* spp.: relationship between antagonism and disease control. Soil Biol. Biockm. 16(4): 391-395.

Karthikeyan, A., V. Shanthi and A. Nagasathya. 2008. Effect of different media and pH on the growth of *Beauveria bassiana* and its parasitism on leaf eating caterpillars. J. of Agriculture and Biological Sciences 4(2): 117-119.

Mathivanan, N., V. R. Prabavathy and V. R. Vijayanandraj. 2005. Application of talc formulations of *Pseudomonas fluorescens* Migula and *Trichoderma viride* Pers. Ex S.F. Gray decrease the sheath blight disease and enhance the plant growth and yield in rice. J. Phytopathology 153: 697-701.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Mesquita, L., M. Antonio and L. A. Lacey. 2001. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), the parasitoid, *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae), and their aphid host. Biological Control 22: 51–59.

Minuto, A., G. Minuto, Q. Mighell, M. Mocioni and M. L. Gullino. 1997. Effect of antagonistic *Fusarium* spp. and of different commercial biofungicide formulations on Fusarium wilt of basil (*Ocimum basilicum* L.). Crop Protection 16(8): 765-769.

Muslim, A., H. Horinouchi and M. Hyakumachi. 2003. Suppression of Fusarium wilt of spinach with hypovirulent binucleate *Rhizoctonia*. J. Gen. Plant Pathol. 69: 143-150.

Padmini Palem, P. C. and Padmaja V. 2010. Impact of different relative humidities on *In vitro* growth and sporulation of entomopathogenic fungal isolates of *Beauveri*a species. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives 1(4): 355-359.

Patiño-Vera, M., B. Jiménez, K. Balderas, M. Ortiz, R. Allende, A. Carrillo and E. Galindo. 2005. Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. J. Appl. Microbiol. 99: 540-550.

Pham, A. T., J. J. Kim, S. G. Kim and K. Kim. 2009. Production of blastospore of entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a submerged batch culture. Mycobiology 37(3): 218-224.

Pietro, A. Di, M. Gut-Rella, J. P. Pachlatko and F. J. Schwinn. 1992. Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off. Phytopathology 82: 131-135.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rayati, J. D., I Nyoman P. Aryantha and P. Arbianto. 2001. The optimization of nutrient factors in spore production of *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith with submerged – surface fermentation system. In: The Fifth Symposium on Agri-Bioche, Tokyo, Japan.

Sahayaraj, K. and S. K. R. Namasivayam. 2008. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. African Journal of Biotechnology 7(12): 1907-1910.

Samšiňáková, A., S. Kálalová, V. Vlcek and J. Kybal. 1981. Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. J. Inverteb. Pathol. 38: 169-174.

Sandoval-Coronado, C. F., H. A. Luna-Olvera, K. Arévalo-Niño, M. A. Jackson and T. J. Poprawski. 2001. Drying and formulation of blastospore of *Paecilomyces fumosoroseus* (Hyphomycetes) produced in two different liquid media. World Journal of Microbiology & Biotechnology 17: 423-428.

Santa, H. S. D., N. J. Sousa, D. Brand, O. R. Dalla Santa, A. Pandey, M. Sobotka, J. Páca and C. R. Soccol. 2004. Conidia production of *Beauveria* sp. By solid-state fermentation for biocontrol of *Ilex paraguariensis* caterpillars. Folia Microbiol. 49(4): 418-422.

Santa, H. S. D., O. R. D. Santa, D. Brand, L. P. de Souza Vandenberghe and C. R. Soccol. 2005. Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. Brazilian Archives of Biology and Technology 48: 51-60.

Sathiyaseelan, K., P. Sivasakthivelan and G. Lenin. 2009. Evaluation of antagonistic activity and shelf life study of *Trichoderma viride*. Bot. Res. Intl. 2(3): 195-197.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sati, S.C. and S. Bisht. 2006. Utilization of various carbon sources for the growth of waterborne conidial fungi. Mycologia 98(5): 678-681.

Soytong, K., S. Kanokmedhakul, V. Kukongviriyapa and M. Isobe. 2001. Application of Chaetomium species (Ketomium®) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: a review article. Fungal Diversity 7: 1-15.

Soytong, K. and K. Ratanacherdchai. 2005. Application of mycofungicide to control late blight of potato. Journal of Agricultural Technology 1(1): 19-32.

Soytong, K., W. Srinon, K. Rattanacherdchai, S. Kanokmedhakul and K. Kanokmedhakul. 2005. Application of antagonistic fungi to control anthracnose disease of grape. Journal of Agricultural Biotechnology 1: 33-41.

Sun, M. H. and L. X. Zhong. 2006. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. Mycopathologia 161: 295-305.

Vidhyasekaran, P. and M. Muthamilan. 1995. Development of Formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. Plant Dis. 79(8): 782-786.

Webster, J. and R.W.S. Weber. 2007. Introduction to Fungi. Cambridge, UK. 841 p.

Wikipedia. 2014. Glycerol. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol.

Wikipedia. 2014. Pumice. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Pumice.

Wikipedia. 2014. Rice. Available Source:http://en.wikipedia.org/wiki/Rice#Nutrients_and_the_nutritional_importance_of_rice.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Wraight, S. P., R. I. Carruthers, S. T. Jaronski, C. A. Bradley, C. J. Garza and S. Galaini-Wraight. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Biological Control 17: 203–217.

Ying, S.-H. and Feng M.-G. 2006. Medium components and culture conditions affect the thermotolerance of aerial conidia of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*. Applied Microbiology 43: 331-335.

Younis, M., K. Mehmood, A. Rashid and A. Ashiq. 2004. Effect of carbon, nitrogen sources and ascorbic acid on the colony growth and acervulus production of *Pestalotia psydii*. Int. J. Agri. Biol. 6(6): 1110-1112.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาล Dextrose	20	กรัม
วุ้น	10	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

2. Potato Carrot Agar (PCA)

มันฝรั่ง	20	กรัม
แครอท	20	กรัม
วุ้น	11	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

3. Yeast extract peptone agar (YPA)

Yeast extract	10	กรัม
peptone	5	กรัม
วุ้น	10	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

4. Water Agar (WA)

วุ้น	11	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9, 20, 40, 60, 90 และ 180 วัน

สูตร	ค่าเฉลี่ยโคโลนีของเชื้อรา ($\times 10^4$ cfu/g)					
	วันที่ 9	วันที่ 20	วันที่ 40	วันที่ 60	วันที่ 90	วันที่ 180
1	39975.00	11610.00	49250.00	39200.00	120.00	12.50
2	47425.00	24100.00	29900.00	6925.00	0.00	0.00
3	78400.00	31500.00	5650.00	3275.00	0.00	0.00
4	10922.50	70550.00	45725.00	5875.00	0.00	0.00
5	0.00	27.50	4170.00	3100.00	0.00	0.00
6	417.50	0.00	0.00	269.00	0.00	0.00
7	6875.00	10577.50	3660.00	5117.50	16400.00	0.00
8	97500.00	1057.50	991.00	1482.50	435.00	51.00
9	5444.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางผนวกที่ 2 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบผงแห้งทั้ง 9 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9, 20, 40, 60, 90 และ 180 วัน

สูตร	ค่าเฉลี่ยโคโลนีของเชื้อรา ($\times 10^5$ cfu/g)					
	วันที่ 9	วันที่ 20	วันที่ 40	วันที่ 60	วันที่ 90	วันที่ 180
1	8.75	44.63	10.13	25.50	30.38	40.13
2	17.75	77.75	6.40	58.25	31.73	2.87
3	41.75	18.10	50.00	36.95	41.45	40.00
4	7.10	0.00	14.10	30.00	39.18	21.85
5	18.90	80.75	88.70	22.95	32.58	34.58
6	9.10	44.93	24.40	33.10	33.60	32.05
7	19.50	24.88	7.35	28.00	3.56	26.55
8	8.25	4.16	12.10	42.68	47.80	16.23
9	60.75	87.75	18.00	40.50	28.40	17.00

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 3 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ในชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ด เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10, 20 และ 30 วัน

สูตร	ค่าเฉลี่ยโคโลนีของเชื้อรา ($\times 10^6$ cfu/g)			
	วันที่ 1	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30
สูตรที่ 1 (PVP K30 + B5)	10.85	6.88	7.75	5.19
สูตรที่ 1+ (PVP K30 + B10)	30.23	20.84	19.56	15.90

ตารางผนวกที่ 4 ความมีชีวิตของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ในชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ด เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10, 20 และ 30 วัน

สูตร	ค่าเฉลี่ยโคโลนีของเชื้อรา ($\times 10^4$ cfu/g)			
	วันที่ 1	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30
สูตรที่ 1 (PVP K30 + C5)	2.88	3.30	2.87	1.88
สูตรที่ 1+ (PVP K30 + C10)	4.82	8.07	4.71	2.24

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวรัชชนก ปิ๋วท่าไม้
วัน เดือน ปี ที่เกิด	11 พฤษภาคม พ.ศ. 2529
สถานที่เกิด	จังหวัดนครปฐม
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประสบการณ์การทำงาน	เจ้าหน้าที่ตรวจแปลงข้าวอินทรีย์ เจ้าหน้าที่ตรวจแปลง ThaiGAP
ผลงาน	รัชชนก ปิ๋วท่าไม้ ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล และรัติยา พงศ์พิสุทธา. 2556.ผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Chaetomium globosum* เพื่อพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืช, น. 167-174. *ใน* **การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 51 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาพืช)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์