การผลิตชีวภัณฑ์เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมแบบอัดเม็ดและการประยุกต์ใช้ในการกำจัดด้วงแรด (*Oryctes rhinoceros* L.)

Production of *Metarhizium anisopliae* as Pellet Bio-product and their Application to Control *Oryctes rhinoceros L.*

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์[1/] อิศเรส เทียนทัด[1/] เมธาสิทธิ์ คนการ[1/] อนุสรณ์ พงษ์มี[1/]
Saowanit popoonsak[1/] Itsares tiantad[1/] Maythasith konkarn[1/] Anusorn pongmee[1/]

ABSTRACT

Rhinoceros beetle (*Oryctes rhinoceros* (L)) is an important insect pest of coconut and palm plants. The implementation of *Metarhizium anisopliae* stain DOA-M5 as biological control agents was used to control Rhinoceros beetle. The research was conducted during January 2015 - December 2017. The objective was to obtain the suitable mass production technology and effectiveness to control the Rhinoceros beetle in the field which focused on practical and inexpensive including unharmed to farmers. Four pellet formulations of *Metarhizium anisopliae* stain DOA-M5 were produced. Results showed that the formulation which consisted of pumice, fresh fungal culture, palm oil and distilled water was the most suitable for pellet bio-pesticide according to short time (38 days) consuming during the process and low cost production (38.82 baht/kg). The efficiency test in semi-greenhouse was 200 gm per cement articial breeding site 0.24 cubic meters. The 27 field trial applications were conducted in coconut plantation in Nakhon Pathom and Samut Songkhram Provinces. The average numbers of larvae in each trap were not statistically different at 48.12 in biopesticide product and 35.43 in fresh culture inoculum. Furthermore, the percentage of larvae infection with Metarhizium fungus in traps were not different in statistic at 87.07% and 77.67% respectively.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, mass production, biopesticide, pumice, trap

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม 10900

[1/] Plant protection research and development office, Department of Agriculture, Chatuchark, Bangkok 10900,Thailand

บทคัดย่อ

ด้วงแรด (*Oryctes rhinoceros* (L)) เป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของมะพร้าว และพืชตระกูลปาล์ม การใช้ราเขียวเมตาไรเซียม *Metarhizium anisopliae* สายพันธุ์ DOA-M5 เป็นวิธีการทางชีววิธีที่สามารถควบคุมด้วงแรดได้ งานวิจัยนี้เริ่มดำเนินการเดือน มกราคม 2558 - ธันวาคม 2560 มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตราเขียวเมตาไรเซียมในรูปแบบชีวภัณฑ์แบบอัดเม็ดที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดด้วงแรด สะดวกต่อการใช้งาน และมีราคาถูก โดยผลิตชีวภัณฑ์จากเชื้อสด และจากโคนิเดียแห้ง จำนวน 4 สูตร ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดด้วงแรด พบว่า ชีวภัณฑ์ สูตรที่ 4 ที่มีส่วนผสมของ Pumice, ราเขียวรูปแบบเชื้อสด, น้ำมันพืช และน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ มีความเหมาะสมสำหรับผลิตในรูปแบบอัดเม็ด เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้น (38 วัน) และมีต้นทุนที่ต่ำ (38.82 บาท/กก.) การทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์เชื้อสดอัดเม็ดสูตรที่ 4 ในสภาพกึ่งเรือนทดลอง แนะนำให้ใช้ชีวภัณฑ์เชื้อสดอัดเม็ดที่อัตรา 200 ก. ต่อพื้นที่กองกับดักที่ใช้วงบ่อซีเมนต์ ขนาดความจุ 0.24 ลบ.ม. การทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ในแปลงเกษตรกรพื้นที่ จ.นครปฐม และ จ.สมุทรสงคราม จากจำนวนกองกับดักทั้งสิ้น 27 กอง พบว่า จำนวนหนอนด้วงแรดที่ลงในกองกับดักที่ใช้ชีวภัณฑ์เชื้อสดอัดเม็ด 48.12 และเชื้อสด 35.43 ตัว ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ และพบหนอนด้วงแรดที่ติดเชื้อเมตาไรเซียมอยู่ที่ 87.07% และ 77.67% ตามลำดับ

คำสำคัญ: ราเขียวเมตาไรเซียม การผลิต, Pumice กองกับดัก

บทนำ

ด้วงแรด (*Oryctes rhinoceros* (L)) เป็นแมลงศัตรูที่สำคัญพบในแหล่งปลูกมะพร้าวและพืชตระกูลปาล์ม มีพฤติกรรมชอบซุกซ่อนตัวเอง ทั้งตัวเต็มวัย ไข่ หนอน และดักแด้ จึงมักพบอยู่ในแหล่งที่ไม่มีแสงสว่าง เฉพาะตัวเต็มวัยเท่านั้นที่ทำลายพืชสด ตัวเต็มวัยจะออกหากินเวลาพลบค่ำ และก่อนพระอาทิตย์ขึ้น โดยตัวเต็มวัยจะบินขึ้นไปกัดเจาะโคนทางใบหรือยอดอ่อนของมะพร้าวหรือปาล์มน้ำมัน รวมทั้งเจาะทำลายยอดอ่อนที่ยังไม่คลี่ ทำให้ทางใบที่เกิดใหม่ไม่สมบูรณ์ มีรอยขาดแหว่งเป็นริ้ว ๆ คล้ายหางปลา หรือรูปพัด ถ้ามะพร้าวถูกทำลายมาก ๆ จะทำให้ใบที่เกิดใหม่แคระแกรน ผลผลิตลดลง ในสภาพธรรมชาติมักพบด้วงแรดบินมาเล่นไฟนีออนหลังฝนตกในเวลากลางคืน ด้วงแรดมักบินไปมาในระยะทางสั้น ๆ ระหว่างแหล่งที่เป็นอาหารและแหล่งขยายพันธุ์ มีรายงานว่า ด้วงแรดสามารถบินได้นาน 2–3 ชม. เป็นระยะทางไกล 2–4 กม. ตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 90–180 วัน วางไข่ครั้งละประมาณ 10–30 ฟอง และวางไข่ได้สูงสุดประมาณ 152 ฟอง วงจรชีวิตตั้งแต่ไข่จนถึงตัวเต็มวัย ใช้เวลาประมาณ 4–9 เดือน โดยเฉลี่ยประมาณ 6 เดือน (ทวีศักดิ์, 2544) ดังนั้นจึงทำความเสียหายให้กับพืชอาหารได้เป็นระยะเวลานาน เนื่องจากแหล่งขยายพันธุ์ของด้วงแรดส่วนใหญ่มักพบตามพื้นดิน หรือกองวัสดุต่าง ๆ ได้แก่ ซากเน่าเปื่อยของตอมะพร้าวหรือปาล์มน้ำมัน ซากทะลายปาล์มน้ำมัน กองมูลสัตว์เก่า กองปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก ขุยมะพร้าว ฯลฯ

การป้องกันกำจัดที่ผ่านมา กรมวิชาการเกษตรได้แนะนำให้ใช้ราเขียวเมตาไรเซียมรูปแบบเชื้อสด (ราเขียวเมตาไรเซียมที่เลี้ยงในธัญพืช)

ในการควบคุมด้วงแรด เสาวนิตย์และคณะ (2548) ได้ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อราเขียว *M. anisopliae* เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นพื้นฐานในการผลิตขยายเชื้อราชนิดนี้ และต่อมา เสาวนิตย์ และคณะ (2553) ได้คัดเลือกหาสายพันธุ์เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมจากธรรมชาติมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูมะพร้าว ได้แก่ หนอนด้วงแรด, หนอนแมลงดำหนาม และหนอนหัวดำมะพร้าว เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท DOA M5 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่เก็บได้จากหนอนด้วงแรดติดเชื้อในแปลงมะพร้าว อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี และได้ใช้สายพันธุ์นี้ในการแนะนำเผยแพร่สู่นักวิชาการและเกษตรกรในการควบคุมหนอนด้วงแรดในเวลาต่อมา ปัจจุบันได้มีการขยายผลถ่ายทอดความรู้ในเรื่องการใช้ราเขียวเมตาไรเซียม ให้กับนักวิชาการเกษตร ของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7 จังหวัดสุราษฎร์ธานี เพื่อนำไปใช้ควบคุมหนอนด้วงแรดในแปลงเกษตรกร และได้นำไปขยายผลในพื้นที่ อ.เกาะสมุย จ.สุราษฎร์ธานี ที่พบการระบาดของหนอนด้วงแรด

ที่ผ่านมาการดำเนินงานและการถ่ายทอดความรู้ต่าง ๆ เป็นการแนะนำและเผยแพร่ในรูปแบบการใช้เชื้อสด ซึ่งสามารถเลี้ยงได้ง่าย แต่มีข้อเสียในเรื่องการขนส่ง ซึ่งไม่สะดวกและสิ้นเปลืองเนื้อที่ในการเก็บรักษา และต้องเก็บไว้ในสภาพเย็นเพื่อรักษาคุณภาพเชื้อ เพราะถ้าเก็บในอุณหภูมิทั่วไปจะไม่สามารถเก็บได้นาน เนื่องจากเชื้อที่เลี้ยงสามารถเจริญเติบโตในอาหารได้ตลอดเวลา และเมื่อใช้อาหารที่เลี้ยงหมด เชื้อที่เลี้ยงไว้ก็จะเสื่อมประสิทธิภาพและตาย สอดคล้องกับ Moslim *et al.* (2013) ที่กล่าวว่า การเลี้ยงเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมในวัสดุเพาะเลี้ยงและนำมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยสปอร์สดเพื่อใช้ในแหล่งขยายพันธุ์ของหนอนด้วงแรดมีข้อจำกัดในเรื่องการใช้ สามารถใช้ได้ในพื้นที่ขนาดเล็ก เนื่องจากเป็นรูปแบบที่เชื้อมีอายุสั้น และการเก็บรักษาเพื่อยืดอายุเชื้อจะต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการผลิตชีวภัณฑ์ของเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม รูปแบบอัดเม็ด (pellets) ที่แตกตัวได้ง่ายเมื่อได้รับความชื้น และสะดวกต่อการหว่านลงในพื้นที่เป้าหมาย เพื่อลดความเสี่ยงจากการปลิวของโคนิเดียเชื้อราเข้าระบบทางเดินหายใจระหว่างการปฏิบัติงาน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การผลิตเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม

1.1 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม (เชื้อสด)

นำเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม (*Metarhizium anisopliae*) สายพันธุ์ DOA-M5 (ซึ่งแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้จากหนอนด้วงแรดติดเชื้อที่ อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี) มาเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว PDB (Potato Dextrose Broth) โดยตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเขียวประมาณ 1 X 1 ซม. ถ่ายใส่ลงในฟลาสค์อาหารเหลว PDB แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน ตรวจเช็คการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ก่อนจะนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนข้าวโพดบดหยาบ โดยเตรียมข้าวโพดบดหยาบ 200 ก. ใส่ในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด (ถุงเพาะเห็ดขนาด 3.5 X 12 นิ้ว) เติมน้ำ 200 มล. ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงถ่ายหัวเชื้อราเขียวที่เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ใส่ในถุงอาหารที่เตรียมในอัตรา 2 มล./ถุง คลุกให้เชื้อกระจายทั่วอาหาร

นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 ± 2°ซ. เป็นเวลา 14 วัน เชื้อราเขียวจะเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียจนเต็มถุง (อาหาร PDB 1 ฟลาสก์ มีสารแขวนลอยโคนิเดียประมาณ 100 มล. ใช้เลี้ยงขยายในอัตรา 2 มล./อาหาร 1 ถุง ในแต่ละครั้งจะใช้เลี้ยงขยายเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมลงบนข้าวโพดบดหยาบได้ประมาณ 10 กก.)

1.2 การเตรียมเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมในรูปแบบโคนิเดียผงอบแห้ง (dry conidia)

นำเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมที่เลี้ยงบนข้าวโพดบดหยาบมาเทใส่ถาดอลูมิเนียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 50 ± 2°ซ. เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นย้ายใส่ตู้ดูดความชื้น ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 วัน หรือจนกว่าข้าวโพดบดหยาบและเชื้อราเขียวที่ได้เริ่มแห้ง และความชื้นลดเหลือ 1% จึงย้ายเชื้อที่ได้ใส่ตะแกรงร่อน นำเข้าเครื่องเขย่า เปิดเครื่องเขย่าเพื่อแยกโคนิเดียเชื้อออกจากข้าวโพดบดหยาบ ใช้อุปกรณ์ดูดผงเชื้อแห้งเก็บใส่ถุงอลูมิเนียมฟอยล์ ปิดปากถุงด้วยเครื่องซีลสุญญากาศ เก็บรักษาในตู้เย็น (อุณหภูมิ 7 ± 2°ซ.) เพื่อรอการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2. การผลิตชีวภัณฑ์เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมในรูปแบบอัดเม็ด (pellet)

นำราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท DOA-M5 ที่เลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณรูปแบบเชื้อสด (ข้อ 1.1) และรูปแบบโคนิเดียแห้ง (ข้อ 1.2) มาใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์รูปแบบอัดเม็ด โดยใช้สารพา (carriers) 4 ชนิด คือ Pumice, talcum, ขุยมะพร้าว และมันสำปะหลัง รวมทั้งน้ำมันพืชมานึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำสารพาดังกล่าวมาผสมกับราเขียวเมตาไรเซียมทั้งในรูปแบบเชื้อสด อัตราส่วนสารพา : ราเขียวเมตาไรเซียมรูปแบบเชื้อสด = 1:1 (โดยผสมรวมกับเชื้อราที่เลี้ยงบนข้าวโพดบดหยาบ) และรูปแบบโคนิเดียผง อัตราส่วนสารพา : ราเขียวเมตาไรเซียมรูปแบบโคนิเดียผง = 1: 12 โดยคำนึงถึงการรวมตัว การเข้ากันได้ การจับเป็นก้อนของส่วนผสมต่าง ๆ รวมทั้งความสามารถในการแตกตัวเมื่อได้รับความชื้น นำสูตรผสมแต่ละสูตรมาเข้าเครื่องอัดเม็ด อบแห้ง และดูดความชื้น จากนั้นนำชีวภัณฑ์อัดเม็ดแต่ละสูตรมาบรรจุใส่ถุงอลูมิเนียมฟอยล์ปิดปากถุงด้วยเครื่องซีลสุญญากาศ เก็บรักษาในตู้เย็น (อุณหภูมิ 7 ± 2°ซ.) จดบันทึกข้อมูลลักษณะทางกายภาพ และเปรียบเทียบขั้นตอน ระยะเวลาในการผลิต

3. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์อัดเม็ดในสภาพห้องปฏิบัติการ

เตรียมกล่องพลาสติกใส แบบมีฝาปิดและเจาะรูที่ฝากล่องขนาด 10 × 7.5 × 5 ซม. จำนวน 40 กล่องต่อ 1 กรรมวิธี ใส่ขุยมะพร้าวนึ่งฆ่าเชื้อ 100 ก./กล่อง พ่นน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อให้ความชื้นแก่ขุยมะพร้าว ใส่ชีวภัณฑ์อัดเม็ดทั้งในรูปแบบเชื้อสดและรูปแบบโคนิเดียผง แยกกันในปริมาณ 2 ก./กล่อง ใส่หนอนด้วงแรดมะพร้าว 1 ตัว/กล่อง ปิดฝากล่องเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการติดเชื้อของหนอนและบันทึกผลทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน (หรือจนกว่าหนอนด้วงแรดจะติดเชื้อราเขียว หรือตายหมด)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์อัดเม็ดในสภาพกึ่งเรือนทดลอง

ทำการทดสอบที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยวางบ่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 ซม. สูง 30 ซม. ใส่แผ่นซีเมนต์รูปวงกลมวางไว้ที่ก้นบ่อเพื่อป้องกันหนอนด้วงแรด

ออกจากบ่อ (ปริมาตรวงบ่อ = 0.24 ลบ.ม.) จำนวน 6 บ่อ ทำการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ 2 อัตรา คือ อัตรา 200 และ 400 ก. เปรียบเทียบกับเชื้อสด 400 ก. ตามคำแนะนำของเสาวนิตย์ และคณะ (2554) โดยทดสอบอัตราละ 2 บ่อ (ซ้ำ) นำชีวภัณฑ์เชื้อสดอัดเม็ดที่เตรียมไว้ใส่ตามกรรมวิธีต่าง ๆ คลุกให้เชื้อราเขียวกระจายทั่วทั้งบ่อ จากนั้นใส่หนอนด้วงแรดมะพร้าวบ่อละ 60 ตัว รดน้ำให้ความชื้นทั่วทั้งบ่อ หลังใส่หนอนด้วงแรด ประมาณ 2 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกจำนวนหนอนที่ติดเชื้อ และหนอนปกติ เพื่อหาเปอร์เซ็นต์หนอนติดเชื้อ นำผลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ และบันทึกระยะเวลาในการติดเชื้อ

5. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์อัดเม็ดในแปลงเกษตรกรที่มีการระบาดของหนอนด้วงแรด

5.1 การเลือกพื้นที่การระบาดของด้วงแรด

เลือกพื้นที่แปลงมะพร้าวของเกษตรกรที่มีการระบาดของหนอนด้วงแรด และเกษตรกรให้ความร่วมมือ โดยประสานกับเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครปฐม ได้เกษตรกรที่มีแปลงปลูกมะพร้าวให้ความร่วมมือจำนวน 6 ราย พื้นที่ทำการทดลองทั้งสิ้น 9 จุด อยู่ในเขตพื้นที่ จ.นครปฐม จำนวน 5 จุด และเขตพื้นที่ จ.สมุทรสงคราม จำนวน 4 จุด

5.2 การสร้างกองกับดักด้วงแรด

ร่วมมือกับเกษตรกรในการสร้างกองกับดัก โดยมุ่งเน้นใช้วัสดุที่มีในพื้นที่ในการกั้นขอบกองกับดัก ขนาด 1.5 X 1.5 X 0.5 ม. พื้นที่ดำเนินการทั้ง 9 จุด จัดทำกองกับดัก จุดละ 3 กองกับดัก รวมกองกับดักทั้งสิ้น 27 กอง และใส่วัสดุผสมในกอง ได้แก่ ปุ๋ยคอก และ มะพร้าวสับ อัตรา 0.5 : 1 โดยปริมาตร เป็นวัสดุล่อในกองกับดัก เพื่อช่วยดึงดูดให้ด้วงแรดมาจับคู่ผสมพันธุ์และวางไข่ เมื่อทำกองกับดักเสร็จจะต้องทิ้งไว้จนกว่ากระบวนการหมักในกองกับดักสิ้นสุด ไม่มีความร้อนเกิดขึ้นภายในกอง ทิ้งไว้เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ เมื่อพบหนอนด้วงแรดในกองกับดักจึงเริ่มทำการทดสอบต่อไป

5.3 การทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ราเขียว

ทดสอบในกองกับดักที่เตรียมในข้อ 5.2 โดยใส่ชีวภัณฑ์ราเขียวรูปแบบเชื้อสดอัดเม็ด และเชื้อสด ตามกรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชีวภัณฑ์เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมอัดเม็ด ใส่ในอัตรา 400 กรัม/กองกับดัก (เนื่องจากพื้นที่กองกับดักมีขนาดใหญ่เป็น 2 เท่าของบ่อซีเมนต์)

กรรมวิธีที่ 2 ราเขียวเมตาไรเซียมรูปแบบเชื้อสด อัตราเดียวกับกรรมวิธีที่ 1

กรรมวิธีที่ 3 ไม่ใส่ราเขียวเมตาไรเซียม (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

พื้นที่ดำเนินการทั้ง 9 จุด จัดทำกองกับดักจุดละ 3 กองกับดัก (กองที่ 1 ใส่เชื้อราเขียวรูปแบบเชื้อสด, กองที่ 2 ใส่เชื้อราเขียวรูปแบบชีวภัณฑ์เชื้อสดอัดเม็ด, กองที่ 3 ไม่ใส่เชื้อราเขียว) คลุกเค้าผสมเชื้อให้เข้ากันดีทั่วกอง แล้วใช้วัสดุ เช่น ทางใบมะพร้าวปิดด้านบนกองกับดัก เพื่อพรางแสงลดความร้อนจากแสงแดด และลดผลกระทบจากรังสียูวี ทิ้งไว้ประมาณ 3-4 สัปดาห์ จึงทำการตรวจนับหนอนด้วงที่ติดเชื้อในกอง โดยบันทึกข้อมูลการติดเชื้อของหนอนด้วงแรดและหนอนปกติ ทั้งก่อน และหลังการใส่ชีวภัณฑ์ราเขียวเมตาไรเซียม เพื่อการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบในแต่ละกรรมวิธี โดย t-test และบันทึกค่าใช้จ่ายในการทำกองกับดักในพื้นที่

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การผลิตเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม

1.1 เลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม

การเลี้ยงเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมในอาหารเหลว PDB เมื่อครบกำหนด 4 วัน จะพบเส้นใยของเชื้อรวมตัวกันเป็นก้อนกลม ๆ เล็ก ๆ ลอยกระจายอยู่ในอาหารเป็นจำนวนมาก ในขั้นตอนนี้ถ้ามีการปนเปื้อนที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย จะไม่พบการรวมตัวของเส้นใย อาหาร PDB ที่ใช้เลี้ยงจะขุ่น และมีกลิ่นเหม็น การทดลองนี้ได้ตรวจสอบการปนเปื้อนด้วยกล้องจุลทรรศน์ ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น จึงนำรามาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนข้าวโพดบดหยาบ พบว่า เชื้อราเขียวเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียจนเต็มถุง ใช้เวลาตามขั้นตอนในการเลี้ยงทั้งหมดประมาณ 41 วัน

1.2 การทำโคนิเดียผงแห้ง

แยกโคนิเดียเชื้อราเขียวออกจากอาหารและอบแห้งเชื้อใช้เวลา 5 วัน แต่ละครั้งจะได้โคนิเดียเชื้ออบแห้งประมาณ 150 ก. ในขั้นตอนการแยกโคนิเดียเชื้อมีโอกาสปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นสูง ถ้าในห้องปฏิบัติการไม่สะอาดพอ

2. การผลิตเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมในรูปแบบอัดเม็ด (pellet)

การผลิตเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมในรูปแบบชีวภัณฑ์อัดเม็ดทั้ง 2 รูปแบบ คือ รูปแบบโคนิเดียแห้งอัดเม็ด และ รูปแบบเชื้อสดอัดเม็ด จำนวน 4 สูตร ผลการทดสอบทางกายภาพ พบว่า สูตรที่ 1 และสูตรที่ 4 ที่มีการใช้ Pumice เป็นส่วนผสมสามารถปั้นขึ้นรูปได้ดี ชีวภัณฑ์ดูดซับน้ำและพองตัวได้ดี สามารถแตกตัวในน้ำได้และไม่มีปัญหาในเรื่องการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นเมื่อทิ้งไว้นาน ๆ (Table 1) ซึ่งแตกต่างจากสูตรที่ 3 ที่มีขุยมะพร้าว Talcum และรำข้าวเป็นส่วนผสม สามารถปั้นขึ้นรูป และแตกตัวในน้ำได้เช่นกัน แต่เมื่อทิ้งไว้นาน ๆ จะพบการปนเปื้อนเชื้อจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ส่วนสูตรที่ 2 ซึ่งมีส่วนผสมของ Talcum สามารถปั้นขึ้นรูปได้ดี ชีวภัณฑ์ดูดซับน้ำ และพองตัวได้ดีสามารถแตกตัวในน้ำได้ดี เช่นกัน

เมื่อพิจารณาต้นทุนการใช้สารพา พบว่า สูตรที่ 1 มีต้นทุนที่ต่ำกว่า โดยราคาของ Pumice และTalcum มีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก Pumice ราคากิโลกรัมละ 10 บาท ในขณะที่ Talcum ราคากิโลกรัมละ 125 บาท (Table 1) ส่วนสูตรผสม (สูตรที่ 3) ถึงแม้จะมีต้นทุนที่ไม่สูงมาก (35.68 บาท/กก.) แต่เมื่อนำมาใช้ทดสอบ พบว่า สูตรผสมเมื่อทิ้งไว้นาน ๆ มีโอกาสปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นในบรรยากาศได้ง่ายกว่าสูตร Pumice และ Talcum ดังนั้นการใช้ Pumice เป็นส่วนผสมในการผลิตจึงมีความเหมาะสมในการใช้ศึกษาต่อไป สอดคล้องกับ เสาวนิตย์ และคณะ (2549) ที่ได้ศึกษาสารพา (carriers) ที่เหมาะสม โดยใช้สารพา 5 ชนิด ได้แก่ Pumice, Smectite, Clinoptilolite, ดินลพบุรี และดินลำปาง ผสมร่วมกับเชื้อราเขียวที่เลี้ยงบนแป้งสาลีในอัตราส่วน 1:1 ผลการศึกษาพบว่า Pumice มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากราเขียวจะสร้างโคนิเดียได้สูงสุด และเชื้อยังเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องได้ 3 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำเมื่อเทียบกับการเลี้ยงโดยใช้สารพาชนิดอื่น

นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบขั้นตอนการผลิตชีวภัณฑ์ทั้งแบบโคนิเดียอบแห้งอัดเม็ด และเชื้อราเขียวสดอัดเม็ด พบว่า การผลิตราเขียวรูปแบบโคนิเดียผงอบแห้งใช้เวลารวมทั้งหมด 46 วัน และการผลิตในแต่ละครั้งใช้เชื้อสด 1,800 ก. จะได้โคนิเดียผงอบแห้งประมาณ 130 ก. ต้นทุนอาหาร และวัสดุประมาณ 81 บาท/130 ก. หรือ 623 บาท/กก. การผลิตราเขียวรูปแบบโคนิเดียโคนิเดียอบแห้งอัดเม็ด ใช้เวลารวมทั้งหมด 51 วัน แต่ละครั้งจะใช้เชื้อสด 4,600 ก. และจะได้เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมแบบโคนิเดียอบแห้งอัดเม็ด ประมาณ 3.60 กก. ต้นทุนอาหารและวัสดุประมาณ 84.72 บาท/กก. ขณะที่การผลิตราเขียวรูปแบบเชื้อสดอัดเม็ด ใช้เวลารวมทั้งหมด 38 วัน ในแต่ละครั้งจะใช้เชื้อสด 2,400 ก. และจะได้เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมแบบเชื้อสดอัดเม็ดประมาณ 5.1 กก. ต้นทุนอาหารและวัสดุประมาณ 38.82 บาท/กก. (Table 2 และ Table 3)

ถ้าพิจารณาทั้งระยะเวลา และต้นทุนการผลิต พบว่า สูตรที่ 1 และ 4 ซึ่งมี Pumice เป็นส่วนผสมหลัก แต่ต่างกันที่ราเขียวที่ใช้ในการผสม โดยสูตรที่ 1 ใช้ราเขียวรูปแบบโคนิเดียอบแห้ง ส่วนสูตรที่ 4 ใช้ราเขียวรูปแบบเชื้อสด ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกัน พบว่า สูตรที่ 4 มีขั้นตอนการผลิตสั้น และต้นทุนการผลิตต่ำกว่าสูตรที่ 1 ดังนั้นจึงเลือกใช้ชีวภัณฑ์สูตรที่ 4 ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

Table 1 Composition and Quality of pellet formulation of *Metarhizium anisopliae* bio-pesticide and cost of carrier

Formulation	Composition	Pellet form	Solubility	Time of pellet soluble (min)	Contamination	Cost of carrier (Baht per kg.)
1	Pumice + dried conidial powder + oil palm + distill water	Pellet forming	Soluble	10	non	10
2	Talcum + dried conidial powder + oil palm + distill water	Pellet forming	Soluble	5	non	125
3	Mixture 1/ + dried conidial powder + oil palm + distill water	Pellet forming	Soluble	3	bacteria	35.68
4	Pumice + fresh conidial culture + oil palm + distill water	Pellet forming	soluble and the best of absorption	5	non	10

Remark: 1/ mixture = coconut oil: Talcum: rice bran = 1: 1: 2

Table 2 Comparison the steps and time of processing the different pellet formulations of *Metarhizium anisopliae* strain DOA-M5 in laboratory

Processing steps	Pellet formulation		
	dried conidial powder	**dried conidial pelletize**	**fresh fungal culture pelletize**
1. The process of stock culture	Growing fungi on PDA 7 days	Growing fungi on PDA 7 days	Growing fungi on PDA 7 days
2. Mass production on liquid media	Mass production in liquid media (PDB) 4 days	Mass production in liquid media (PDB) 4 days	Mass production in liquid media (PDB) 4 days
3. Mass production on crushed maize	Mass production oncrushed maize for 30 days	Mass production on crushed maize for 30 days	Mass production on crushed maize for 20 days
4. The reduced of moisture and dried	Dried at 40 ± 3°C 1 day	Dried at 40 ± 3 °C 1 day	-
	Reduced the moisture in Desicator for 3 days	Reduced the moisture in Desicator for 3 days	
5. Formulation process	Harvesting fungal conidia by mechanical classication using sieves on a vibratory shaker for 1 day	Harvesting fungal conidia by mechanical classication using sieves on a vibratory shaker for 1 day	Mixed with carrier and formulated
	Pack up the product by using aluminum foil in vacuum system (7 ± 2°C)	Mixed with carrier and formulated	Dried at 40 ± 3°C 1 day
		Dried at 40 ± 3°C 1 day	Reduced the moisture in Desiccator for 6 days
		Reduced the moisture in Desiccator 3 days	Pack up the product by using aluminum foil in vacuum system (7 ± 2°C)
		Pack up the product by using aluminum foil in vacuum system (7 ± 2°C)	
Time of processing	**46 days**	**51 days**	**38 days**

Table 3 The processing time and product cost of two *Metarhizium anisopliae* bio-pesticide formulations

Type of pellet	Time of processing	Number of BCA production (kg)	Cost of BCA (Bath / kg)
dried fungal conidial culture	51	3.60	84.72
fresh fungal conidia culture	38	5.1	38.82

3. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ราเขียวรูปแบบอัดเม็ดสูตรผสมต่าง ๆ กับหนอนด้วงแรด พบว่า ชีวภัณฑ์ราเขียวทุกสูตร ทำให้หนอนด้วงแรดติดเชื้อราเขียวได้ดีใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่สูตรที่ 2, 3 และ 4 ถึงแม้จะทำให้หนอนด้วงแรดติดเชื้อราเขียวได้ดี แต่มักพบปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ๆ ในชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้ (Table 4)

อย่างไรก็ดีข้อจำกัดในการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งกับหนอนด้วงแรดในห้องปฏิบัติการมักพบปัญหาความอ่อนแอ และการติดเชื้อแบคทีเรียของหนอนระหว่างทำการทดลอง ซึ่งในการทดลองจำเป็นต้องใช้หนอนด้วงแรดจากธรรมชาติในการศึกษา ไม่สามารถเลี้ยงขยายเพื่อการทดสอบในห้องปฏิบัติการ หรือสภาพกึ่งเรือนทดลองได้ เนื่องจากวงชีวิตที่สมบูรณ์ของด้วงแรดมีระยะเวลานานเป็นปี ในการทดสอบจำเป็นต้องใช้หนอนด้วงแรดจำนวนมาก จึงไม่สามารถผลิตขยายได้ทันตามจำนวนที่ต้องการ ดังนั้น เพื่อแก้ปัญหานี้จึงจำเป็นต้องรับซื้อหนอนด้วงแรด โดยการจ้างเก็บจากธรรมชาติ ซึ่งถ้าทำการทดสอบในช่วงหน้าฝน มักพบปัญหาความอ่อนแอและการติดเชื้อแบคทีเรียของหนอนจากสภาพธรรมชาติ

Table 4 The efficacy of pellet formulation of *Metarhizium anisopliae* bio-pesticide on *Oryctes rhinocerosle* larvae in laboratory condition

Treatment	Number of tested larvae	No. of larvae Infected with Metarhizium	% Infected larvae with Metarhizium	No. of larvae Infected with bacteria	% Infected larvae with bacteria
Formulation 1	40	40	100	0	0
Formulation 2	40	39	97.5	1	2.5
Formulation 3	40	38	95	2	5
Formulation 4	40	39	97.5	1	2.5
Fresh fungal culture	40	20	50	20	50
No fungal application	40	0	0	2	5

4. ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์เชื้อสดอัดเม็ดในสภาพกึ่งเรือนทดลอง

ผลการทดสอบ พบว่า ชีวภัณฑ์ราเขียวเชื้อสดอัดเม็ด มีประสิทธิภาพทำให้หนอนด้วงแรดติดเชื้อราเขียวใกล้เคียงกับการใช้เชื้อสดรูปแบบเดิมที่เคยแนะนำ โดยเสาวนิตย์และคณะ (2554) ในการทดสอบครั้งที่ 1 พบหนอนด้วงแรดมีการติดเชื้อราเขียว 96.55, 97.96 และ 62.75% เมื่อใช้ชีวภัณฑ์เชื้อสดอัดเม็ดอัตรา 200, 400 ก. และเชื้อสด 400 ก. ตามลำดับ (Table 5) และการทดสอบครั้งที่ 2 พบการติดเชื้อราเขียวของหนอนด้วงแรดที่ 89.29, 95.35 และ 55.26% ตามลำดับ เนื่องจากการติดเชื้อราเขียวของหนอนด้วงแรดที่ศึกษาทั้ง 2 ครั้ง สอดคล้องกันจึงแนะนำให้ใช้ชีวภัณฑ์เชื้อสดอัดเม็ดที่อัตรา 200 ก. ต่อพื้นที่กองกับดักที่ใช้วงบ่อซีเมนต์ ขนาดความจุ 0.24 ลบ.ม.

Table 5 The efficacy test of bio- control agent pellet (formula 4) at different doses on Coconut Rhinoceros Beetle larvae in semi-green house

Treatment	number of tested larvae	Trail 1		Trail 2	
		fungal infected larvae (%)*	bacteria infected larvae (%)	fungal infected larvae (%)	bacteria infected larvae (%)
Bio-pesticide 200 g	60	96.55	3.45	89.29	10.71
Bio-pesticide 400 g	60	97.96	2.04	95.35	4.65
Fresh fungal culture 400 g	60	62.75	37.25	55.26	44.74

* fungal infected larvae (%) = $\frac{\text{number of tested larvae –number of fungal infected larvae X100}}{\text{number of tested larvae}}$

5. การใช้ชีวภัณฑ์เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมอัดเม็ดกำจัดหนอนด้วงแรดในแปลงเกษตรกร

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในการกำจัดหนอนด้วงแรดที่กำลังระบาดในแปลงเกษตรกร จำนวน 9 จุด จากการตรวจนับจำนวนหนอนที่ปกติ และหนอนที่ติดเชื้อในกอง พบว่าการใช้เชื้อราเขียวรูปแบบชีวภัณฑ์เชื้อสดอัดเม็ดและรูปแบบเชื้อสดในกองกับดัก จำนวนหนอนด้วงแรดเฉลี่ย ที่พบในกองกับดักทั้ง 27 กอง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ (Table 6) โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนหนอนที่พบในกองกับดักชีวภัณฑ์เชื้อสดอัดเม็ด 48.12 ตัว และกองกับดักเชื้อสด 35.43 ตัว แสดงว่าการทำกองกับดักในแต่ละที่มีการดึงดูดให้ด้วงแรดมาลงวางไข่ในพื้นที่ค่อนข้างสม่ำเสมอกัน และพบว่า เปอร์เซ็นต์หนอนด้วงแรดที่ติดเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมในกองกับดักไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติเช่นกัน โดยหนอนด้วงแรดที่ติดเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมในกองกับดักชีวภัณฑ์รูปแบบเชื้อสดอัดเม็ด และกองกับดักรูปแบบเชื้อสดที่ 87.07 และ 77.67% การนับจำนวนหนอนติดเชื้อจะสังเกตุได้จากหนอนด้วงแรดที่เริ่มติดเชื้อจะมีรอยแผลสีน้ำตาลที่พบข้างลำตัว (Figure 2) (Moslim *et al*., 2013) และการติดเชื้อโดยสมบูรณ์ในกองกับดักจะพบประมาณสัปดาห์ที่ 3-4 (เสาวนิตย์และคณะ, 2554)

Table 6 Average number of the Coconut rhinoceros beetle larvae and percentages of *Metarhizium anisopliae* infection in articial breeding sites

Data	fresh fungal conidial pellet	fresh fungal culture	t-test
Average* of larvae number in articial breeding sites	48.12	35.43	0.68 ns
percentage of infected larvae	87.07	77.67	0.78

*Average of 9 experiment points

Figure 2 (A) Brown spot on larvae caused by early infection of *Metarhizium anisopliae* strain DOA – M5. and (B) completed infection larvae in articial breeding site at 3-4 weeks after inoculation

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สูตรการผลิตราเขียวเมตาไรเซียมในรูปแบบชีวภัณฑ์ที่เหมาะสม คือ สูตรที่มี Pumice เป็นส่วนผสม ซึ่งประกอบด้วย Pumice, ราเขียวรูปแบบเชื้อสด, น้ำมันพืช และน้ำนึ่ง ส่วนผสมดังกล่าวสามารถปั้นขึ้นรูปได้ดี ชีวภัณฑ์ดูดซับน้ำและพองตัวได้ดี สามารถแตกตัวในน้ำภายใน 5 นาที ใช้ระยะเวลาในการผลิตประมาณ 38 วัน และมีต้นทุนที่ต่ำ คือ 38.82 บาท/กก. ผลการทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนด้วงแรดในห้องปฏิบัติการ พบว่า หนอนด้วงแรดติดเชื้อราเขียวสูงถึง 97.5% และการทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์เชื้อสดอัดเม็ด ในสภาพกึ่งเรือนทดลอง แนะนำให้ใช้ชีวภัณฑ์เชื้อสดอัดเม็ดที่อัตรา 200 ก. ต่อพื้นที่กองกับดักที่ใช้วงบ่อซีเมนต์ ขนาดความจุ 0.24 ลบ.ม. สามารถทำให้หนอนด้วงแรดติดเชื้อราเขียว 96.55% และผลการใช้เชื้อราเขียวรูปแบบชีวภัณฑ์เชื้อสดอัดเม็ด ในพื้นที่การระบาดของหนอนด้วงแรดในพื้นที่ทดสอบ จ.นครปฐม และจ.สมุทรสงคราม พบว่า หนอนด้วงแรดที่ติดเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมเชื้อสดอัดเม็ดในกองกับดัก 87.07% ขณะที่กองกับดักเชื้อสดพบหนอนติดเชื้อราเขียวเพียง 77.67%

ดังนั้น เกษตรกรสามารถนำชีวภัณฑ์เชื้อราเขียว เมตาไรเซียมรูปแบบเชื้อสดอัดเม็ดไปใช้ในการควบคุมหนอนด้วงแรดศัตรูมะพร้าวและพืชตระกูลปาล์มได้ เพราะมีขั้นตอนการผลิตง่าย ต้นทุนต่ำ ใช้เวลาสั้น และมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนด้วงแรดศัตรูมะพร้าวได้ดี ผู้ประกอบการ และกลุ่มเกษตรกรสามารถนำไปต่อยอดเพื่อผลิตในเชิงพาณิชย์ได้

เอกสารอ้างอิง

ทวีศักดิ์ ชโยภาส. 2544. *แมลงศัตรูปาล์มน้ำมันในประเทศไทย.* เอกสารวิชาการกลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูพืชสวนอุตสาหกรรม กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ISBN 974-436-073-9: 97-104.

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ อภิรัชต์ สมฤทธ์ และอนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ. 2548. การวิจัยและพัฒนาการผลิตและใช้เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* เพื่อประโยชน์ทางการเกษตร, หน้า 1785-1808. *ใน:* รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2548 เล่มที่ 2 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ISBN: 374-436-561-7

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ วัชรี สมสุข อภิรัชต์ สมฤทธ์ สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต และสาทิพย์ มาลี. 2549. ศึกษาสารพา (carriers) ที่เหมาะสมในการใช้ร่วมกับผลิตภัณฑ์แป้ง. หน้า 536-545. *ใน:* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549 เล่ม 1. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ เกรียงไกร จำเริญมา และสาทิพย์ มาลี. 2553. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae*. หน้า 842-853. *ใน:* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่ม 2 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. เอกสารวิชาการ ลำดับที่ 1/2554 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ อิศเรส เทียนทัด วิไลวรรณ เวชยันต์ และ ยุทธนา แสงโชติ. 2554. ศึกษาอัตราการใช้เชื้อราเขียว *M. anisopliae* (Metsch) Sorokin ในการควบคุมหนอนด้วงแรดมะพร้าว. หน้า 2104 - 2113. *ใน:* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554 เล่ม 4. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เอกสารวิชาการ ลำดับที่ 1/2555 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ

Moslim, R., N. Kamarudin, N.H. Hamid and C.M.R.Z. Abidin. 2013. Delivery Techniques of Metarhizium for Biocontrol of Rhinoceros Beetles in Oil Palm Plantations. *The planter; Kuala Lumpur;* Vol 89, No 1049: 571-583.