บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่และระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้เริ่มดำเนินการตั้งแต่ ตุลาคม พ.ศ. 2551 – กันยายน พ.ศ. 255 2 รวมระยะเวลา 1 ปี โดยมีสถานที่ทำการวิจัย ได้แก่พื้นที่ปลูกพืชผักวงศ์กะหล่ำในจังหวัดสุพรรณบุรี 4 แห่ง คือ ตำบลโคกโคเฒ่า และ ตำบลท่าระหัด อ. เมือง ต. สองพี่น้อง อ. สองพี่น้อง ต. ศรีประจัน อ. ศรีประจัน และ อ. เดิมบางนางบวช จังหวัด และในพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ ตำบลหนองหารป่าไผ่ แม่แฝก และร่มหลวง อำเภอสันทราย และโครงการหลวงหนองหอย อ. สะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ ห้องปฏิบัติการโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต กรุงเทพฯ และศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนบน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. ตู้สำหรับเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ (laminar flow)
2. หม้อนึ่งความดันไปน้ำ (Tomy autoclave ss-320, Tomy Seiko Co.Ltd., Japan)
3. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope
4. กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope
5. อุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยา
6. วัสดุการเกษตรสำหรับปลูกพืชเพื่อการทดสอบในสภาพควบคุม
7. อุปกรณ์พื้นฐานในการเก็บตัวอย่างแมลงโรคพืชและเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในภาคสนาม

3.3 สารเคมีและอาหารเทียมที่ใช้ในการทดลอง

1. Potato Dextrose Agar (PDA) HiMedia Laboratories PVt. Ltd. Mumbai-400 086, India
2. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) BIOMARK Laboratory Pune 411011,India Nutrient agar
3. Yeast Extract (Scharlau Chemie S.A. Barcelona, Spain Made in European Union)
4. Malt Extract Agar (MEA) (Scharlau Chemie S.A. Barcelona, Spain Made in European Union)
5. Beef Extract (Becton Dickinson Microbiolog systems Company, Spatks, USA)
6. Peptone (Hi Media Laboratories PVt. Ltd. Mumbai-400 086, India)
7. Casein Acid Hydrolysate (HIMEDIA Laboratories Pvt. Limited, Mumbai, India
8. Agar (ผงวุ้น)
9. Malt Extract (Fluka biochemika)
10. Magnesium sulphate, Maso47H2O) (CARLO ERBA REAGENTI, France)
11. K2HPO4 (CARLO ERBA REAGENTI, France)
12. Glycerol
13. Dextrose (DIFCO, BECTON DICKINSON, MD, USA)
14. น้ำมันพืช
15. สารจับใบ
16. ปุ๋ยเคมี
17. สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช
18. สูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*
19. สารเคมีพื้นฐานที่ใช้ในการฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยา

3.4 วิธีการวิจัย

3.4.1 สำรวจเชื้อรา *Beauveria bassiana* เพิ่มเติมในพื้นที่สำรวจ จังหวัดสุพรรณบุรี และเชียงใหม่

สำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงศัตรูของพืชผักวงศ์กะหล่ำที่ถูกทำลายโดยเชื้อรา *B. bassiana* จากพื้นที่ปลูกพืชผักวงศ์กะหล่ำในจังหวัดสุพรรณบุรี 5 แหล่ง คือ ตำบลโคกโคเฒ่า และ ตำบลท่าระหัด อ. เมือง ต. สองพี่น้อง อ. สองพี่น้อง ต. ศรีประจัน อ. ศรีประจัน และ อ. เดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 5 จุดต่อหนึ่งตำบล โดยแต่ละจุดมีพื้นที่ปลูกไม่น้อยกว่า 50 ตารางวา และตั้งอยู่ห่างกันไม่น้อยกว่า 3 กิโลเมตร แต่ไม่เกิน 10 กิโลเมตร รวมทั้งหมด 25 จุด ทำการสุ่มนับจำนวนแมลงศัตรูพืชแบบนับทั้งต้น จำนวน 100 ต้น ต่อจุด โดยแต่ละต้นอยู่ห่างกัน 10 ต้น และจากพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ ในเขต ตำบลหนองหาร ป่าไผ่ แม่แฝก และร่มหลวง อำเภอสันทราย และโครงการหลวงหนองหอย อ. สะเมิง จำนวน 5 จุดต่อหนึ่งตำบล โดยแต่ละจุดมีพื้นที่ปลูกไม่น้อยกว่า 50 ตารางวา และตั้งอยู่ห่างกันไม่น้อยกว่า 3 กิโลเมตร รวมทั้งหมด 25 จุด ทำการสุ่มนับจำนวนแมลงศัตรูพืชแบบนับทั้งต้น จำนวน 100 ต้น ต่อจุด โดยแต่ละต้นอยู่ห่างกัน 10 ต้น โดยพิจารณาดังนี้

เชื้อรา *B. bassiana* สามารถทำลายแมลงทุกระยะของการเจริญเติบโต และพบได้ในแมลงศัตรูพืชผักวงศ์กะหล่ำเกือบทุกชนิด การพิจารณาเก็บตัวอย่างจะสังเกตอาการที่พบ คือแมลงที่ตายจะแห้งและแข็งมีลักษณะคล้ายมัมมี่ หรือมัสคาดีนสีขาว (white muscardine) ลำตัวของแมลงอาจติดอยู่กับส่วนต่างของพืช โดยเกิดจากการที่เชื้อราได้เข้าไปเจริญในตัวแมลงและแทงเส้นใยออกมาจากตัวแมลงที่ตาย ยึดติดกับส่วนของพืชอาศัยที่แมลงนั้นทำลายอยู่ จากนั้นมีการผลิตเส้นใยและสปอร์สีขาวปกคลุมตัวแมลง เมื่อสังเกตพบแมลงที่มีลักษณะดังที่กล่าวมานี้ ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างโดยตัดชิ้นพืชที่มีแมลงที่ตายอยู่จากต้นพืช และเก็บในกล่องพลาสติกใสขนาด 6 x 3 เซนติเมตร ที่รองด้วยกระดาษทิชชูที่แห้งและผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว และมีรูระบายความชื้นที่ฝากล่อง 1-3 รู จากนั้นเก็บกล่องดังกล่าวใส่ภาชนะเก็บความเย็นซึ่งภายในบรรจุน้ำแข็งแห้งเพื่อนำไปแยกเชื้อและพิสูจน์จำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการต่อไป

นำตัวอย่างแมลงที่ตายซึ่งเก็บจากแปลงเกษตรกรมาตรวจหาของสปอร์และโครงสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หากพบการสร้างสปอร์ จึงนำมาทำการแยกเชื้อด้วยวิธี dilution plate technique โดยชิ้นส่วนของแมลงที่ตายและมีสปอร์ติดอยู่ มาละลายในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เจือจางแบบเป็นชุดลดหลั่นตามความเข้มข้น (series) ให้ได้ความเข้มข้น $1x10^4$ นำสารละลายนี้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

ที่เตรียมไว้ บ่มในสภาพอุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส) จากนั้นประมาณ 3-5 วัน เมื่อพบโคโลนีเดี่ยวซึ่งมีลักษณะสีขาวของเชื้อราเจริญบนผิวอาหาร ใช้เข็มเขี่ยแยกมาเพาะเลี้ยง (subculture) บนผิวของอาหาร Malt extract agar บ่มในสภาพอุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส) นาน 5-7 วัน เมื่อพบการสร้างสปอร์ของเชื้อโดยสังเกตจากการพบผงสีขาวขุ่นบนผิวของอาหาร และเมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบสปอร์ที่มีลักษณะกลม-รี ใส ขนาดประมาณ 2.5-4.5 ไมโครเมตร อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรือเดี่ยว นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์อีกครั้งด้วยวิธี dilution plate technique โดยใช้ loop ที่ปลอดเชื้อแตะสปอร์ที่เกิด มาละลายในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเจือจาง แบบเป็นชุดลดหลั่นตามความเข้มข้น (series) ให้ได้ความเข้มข้น $1x10^{6}$ นำสารละลายนี้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA บ่มในสภาพอุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส) จากนั้น 3-5 วัน เมื่อพบโคโลนีเดี่ยวจึงทำการ subculture เชื้อไปเก็บในอาหารวุ้น Malt extract agar เอียง (slant agar) ในหลอดทดลองและเก็บในเครื่องทำความเย็นที่ 4-5 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป พร้อมกันนี้ได้มีการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี เส้นใย และสปอร์ ของเชื้อราเพื่อการจำแนกชนิดที่ถูกต้อง โดย อาศัยเอกสารอ้างอิง (Steinhaus, 1967; Pionar and Thomas, 1984; Tanada and Kaya, 1993; Holt *et al*., 2000) รวมทั้งปรึกษาผู้เชี่ยวชาญด้วย

นอกจากนี้ได้มีการเก็บตัวอย่างดิน จากแปลงปลูกพืชผักวงศ์กะหล่ำ โดยการสุ่มเก็บในพื้นที่ขนาด 50 x 50 เมตร ที่ความลึก 0 – 15 เซนติเมตร พื้นที่ละจำนวน 5 จุด ๆ ละ 500 กรัม ต่อจุด รวมเป็น 2,500 กรัมต่อหนึ่งพื้นที่ตำบล นำตัวอย่างแยกบรรจุถุงพลาสติกใส ติดฉลากแสดงตำแหน่งที่เก็บ และรายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะนิเวศวิทยาของพื้นที่ เก็บในที่เย็น และนำไปศึกษารายละเอียดต่อ ณ ห้องปฏิบัติการ แยกเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญอยู่ในดินต่อไปด้วยวิธีใช้เหยื่อแมลง (insect batting) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lacey (1997) โดยนำตัวอย่างดินจากแต่ละจุดมาบรรจุในกล่องพลาสติกใสขนาด 7.5 x 9 x 4 นิ้ว กล่องละ 500 กรัม 5 กล่องต่อหนึ่งพื้นที่หนึ่งตำบล จากนั้นพ่นน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนดินเกิดความชื้นประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ และปล่อยหนอนไหม (*Bombix mori*) วัย 3-4 จำนวน 20 ตัวต่อกล่อง และให้ใบหม่อนเป็นอาหารตามความเหมาะสม บ่มกล่องไว้ ณ อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 20-25 องศาเซลเซียส) เปลี่ยนอาหารและพ่นละอองน้ำตามความจำเป็น จากนั้นตั้งแต่วันที่ 14 หลังการบ่ม เริ่มทำการตรวจหาหนอนที่ตายโดยมีลักษณะแข็งและแห้ง ลำตัวปกคลุมด้วยเส้นใยและสปอร์สีขาว และนำไปแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี dilution plate technique ต่อตามรายละเอียดที่กล่าวมาข้างต้น

3.4.2 คัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *B. bassiana* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญของพืชผักวงศ์กะหล่ำ

ประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมด้วงหมัดผัก และเพลี้ยอ่อนผัก และหนอนกระทู้ผักซึ่งเป็นแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญของพืชผักวงศ์กะหล่ำ โดยแมลงที่นำมาทดสอบบางส่วนจะได้จากการเก็บตัวอย่างจากธรรมชาติ และบางส่วนจะได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยการเลี้ยงแมลงที่จะทำการทดสอบด้วยพืชอาศัยของแมลง คือคะน้า ที่เตรียมไว้ในเรือนทดลองโดยมีการให้น้ำและปุ๋ยตามขบวนการที่เกษตรกรใช้ แต่ไม่มีการใช้สารเคมี และนำแมลงที่ไม่เป็นโรคซึ่งเก็บได้จากแปลงเกษตรกรมาเลี้ยงโดยใช้พืชที่เตรียมไว้ ให้แมลงมีการขยายพันธุ์จนได้รุ่นลูก (generation) ประมาณ 2-3 รุ่น เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นแมลงที่ไม่มีการติดเชื้อ (ปลอดโรค) นำมาทดสอบพ่นสารละลายสปอร์ของเชื้อที่ความเข้มข้น 10^{3} - 10^{8} สปอร์ต่อมิลลิลิตรกับแมลงศัตรูผักวงศ์กะหล่ำแต่ละชนิดซึ่งเตรียมไว้ โดยการทดสอบ จำนวน 50 ตัว ต่อซ้ำ จำนวน 4 ซ้ำ (Pionar and Thomas, 1984) เปรียบเทียบกับ วิธีการที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (control)

จากนั้นนำแมลงที่ได้รับการทดสอบไปเลี้ยงต่อในสภาพปรกติโดย มีการให้อาหารและสิ่งแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติมากที่สุด สังเกตอาการของแมลงและนับจำนวนทุก 24 ชั่วโมง และหาเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงที่ทดสอบ จากนั้นนำข้อมูลการตายของด้วงมาปรับค่าเป็นค่าการตายที่ถูกต้อง (corrected control mortality) กับการตายในตัวเปรียบเทียบ โดยใช้สูตร Abbot's Correction (Abbott, 1925) ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ตายของแมลงที่ทดสอบ

$$= \frac{\%\text{การตายของแมลงที่ได้รับเชื้อ} - \%\text{ตายของแมลงที่ไม่ได้รับเชื้อ}}{\%\text{ตายของแมลงที่ไม่ได้รับเชื้อ}} \times 100$$

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (Percent cumulative mortality - PCM) และคำนวณค่าเฉลี่ยของเวลาถึงการตาย (Mean time to death - MTD) และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างตามนัยสำคัญทางสถิติ และ ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแล้ว จึงทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ย ตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS V. 11

3.4.3 การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของเชื้อและทดสอบใช้เชื้อ *B. bassiana* สายพันธุ์ต่าง ๆ และการทดสอบควบคุมแมลงศัตรูพืชผักวงศ์กะหล่ำบนต้นกะหล่ำใน สภาพควบคุม

หลังจากได้เชื้อรา *B. bassiana* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูพืชผักวงศ์กะหล่ำแล้ว ทำการคัดเลือกวัสดุเพาะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของเชื้อราที่มีศักยภาพในการทำลายแมลง โดยทดสอบเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในวัสดุเพาะที่สามารถหาได้ในท้องถิ่นได้แก่ อาหารปลาสำเร็จรูป อา หารสุนัขสำเร็จรูป อาหารไก่สำเร็จรูปแบบอัดเม็ด ข้าวสารหักนึ่งสุก เมล็ดข้าวเปลือกนึ่งสุก เมล็ดข้าวฟ่างหนึ่งสุก และเมล็ดข้าวโพดบดนึ่งสุก โดยเตรียมวัสดุดังกล่าวในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ภายในขวดบรรจุวัสดุเพาะที่มีน้ำหนักเปียก 150 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปลูกเชื้อราที่เลี้ยงในอาหาร SDA อายุ 7 วัน ลงในวัสดุเพาะที่เตรียมไว้ บ่มในสภาพอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 – 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10- 14 วัน และวัดผลโดยการประเมินสัดส่วนการเจริญเติบโตของเส้นใย สัดส่วนการสร้างสปอร์ของเชื้อในวัสดุเพาะ และความเข้มข้นของสปอร์ในวัสดุเพาะ วางแผนการทดลองแบบ CRD มีการทำซ้ำ วิธีการทดลองละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ หากพบนัยสำคัญ ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS V. 11

หลังจากขยายปริมาณเชื้อรา *B. bassiana* ตามวิธีที่เหมาะสมแล้วทดสอบควบคุมแมลงศัตรูพืชผักวงศ์กะหล่ำบนต้นกะหล่ำในสภาพควบคุม ซึ่งในที่นี้จะทำการทดสอบกับแมลงศัตรูสำคัญของพืชผักวงศ์กะหล่ำสามชนิดได้แก่ ด้วงหมัดผัก หนอนกระทู้ผัก และเพลี้ยอ่อนผัก เริ่มการทดลองโดยมีการจัดการทดลองแบบแฟกทอเรียลในการวางแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) ที่ประกอบด้วย 2 ปัจจัยหลักได้แก่รูปแบบของสูตรผสมซึ่งได้แก่การใช้สูตรผสมน้ำมัน สูตรผสมน้ำ และรูปแบบการใช้เชื้อ *B. bassiana* เพียงอย่างเดียว และแบบใช้ เชื้อ *B. bassiana* ร่วมกับเชื้อโรคแมลงชนิดอื่นซึ่งได้แก่เชื้อ *Bacillus thuringiensis* (Bt). และ *Metarhizium* sp. โดยกำหนดวิธีทดลองดังนี้

1. การใช้เชื้อรา *B bassiana* แบบผสมน้ำ ที่ระดับความเข้มข้นเข้มข้น 10^{7} สปอร์ต่อมิลลิลิตร พ่นทางใบพ่นทุก 7 วัน
2. การใช้เชื้อรา *B bassiana* แบบผสมน้ำมัน ที่ระดับความเข้มข้นเข้มข้น 10^{7} สปอร์ต่อมิลลิลิตร พ่นทางใบพ่นทุก 7 วัน

3. การพ่นเชื้อราแบบผสมน้ำ *B. bassiana* ที่ระดับความเข้มข้นเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ผสมน้ำร่วมกับการพ่นเชื้อ Bt. สูตรสำเร็จที่ระดับความเข้มข้นเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พ่นทางใบพ่นทุก 7 วัน
4. การพ่นเชื้อราแบบผสมน้ำมัน *B. bassiana* ที่ระดับความเข้มข้นเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ผสมน้ำร่วมกับการพ่นเชื้อ Bt. สูตรสำเร็จที่ระดับความเข้มข้นเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พ่นทางใบพ่นทุก 7 วัน
5. การพ่นเชื้อราแบบผสมน้ำ *B. bassiana* ที่ระดับความเข้มข้นเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ผสมน้ำร่วมกับการพ่นเชื้อ *Metarhizium* sp. ที่ระดับความเข้มข้นเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรพ่นทางใบพ่นทุก 7 วัน
6. การพ่นเชื้อราแบบผสมน้ำมัน *B. bassiana* ที่ระดับความเข้มข้นเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ผสมน้ำร่วมกับการพ่นเชื้อ *Metarhizium* sp. ที่ระดับความเข้มข้นเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรพ่นทางใบพ่นทุก 7 วัน
7. การใช้สารเคมีตามปรกติ ตามโปรแกรมที่ใช้กับพืชผักวงกะหล่ำโดยทั่วไป โดยใช้สารอะบาเมกติน ในอัตรา 20 มล.ต่อน้ำ 20 ลิตร สารอะบาเมกติน ในอัตรา 30 มล.ต่อน้ำ 20 ลิตร สารโพรฟีโนฟอส อัตรา 30 มล. ต่อน้ำ 20 ลิตร และ โพรไทโอฟอส 30 มลต่อน้ำ 20 ลิตร สำหรับหนอนใยผัก หนอนกระทู้ผัก ด้วงหมัดผัก และเพลี้ยอ่อนผัก ตามลำดับ

ก่อนเริ่มการทดลอง ปลูกคะน้า ในกระถางเพาะในโรงเรือนที่ครอบด้วยมุ้งสำหรับปลูกผัก โดยอุณหภูมิในโรงบเรือนประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส ในการดูแลต้นพืช มีการให้น้ำและปุ๋ยจนต้นคะน้าอายุ 15 วัน และปล่อยแมลงศัตรูพืชเป้าหมายจำนวน 20-30 ตัวต่อต้น จากนั้นเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อโรคแมลงที่ทดสอบโดยเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อโดยนำเชื้อที่เจริญในวัสดุเพาะอายุ 15 วันมาละลายในน้ำกลั่นและปรับความเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน กรองด้วยตระแกรงร่อนแป้งและเติมสารจับใบ 1 ช้อนชา และเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อโดยนำเชื้อที่เจริญในวัสดุเพาะอายุ 15 วันมาละลายในน้ำมันให้ได้ความความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน กรองด้วยตระแกรงร่อนแป้งและเติมสารจับใบ 1 ช้อนชา และพ้นสารตามวิธีการที่กำหนดไว้ในแผนการทดลองข้างต้นหลังจากพ่นสปอร์ของเชื้อที่ทดสอบครั้งแรก เก็บและบันทึกข้อมูลโดยนับจำนวนแมลงที่ตายทุก 24 ชั่วโมง หาเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงที่ทดสอบจากนั้นนำข้อมูลการตายของด้วงมาปรับค่า (corrected control mortality) กับการตายในตัวเปรียบเทียบ โดยใช้ สูตร Abbot's Correction (Abbott ,1925) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (Percent cumulative mortality - PCM)

และคำนวณค่าเฉลี่ยของเวลาถึงการตาย (Mean time to death - MTD) และ นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างตามนัยสำคัญทางสถิติโดย วิเคราะห์ความแปรปรวน เพื่อหานัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 9 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแล้ว จึงทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ย ตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS V. 11

3.4.4 เผยแพร่ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับการควบคุมแมลงศัตรูศัตรูผักวงศ์กะหล่ำโดยใช้เชื้อ *B. bassiana*

เผยแพร่ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับการควบคุมแมลงศัตรูศัตรูผักวงศ์กะหล่ำโดยใช้เชื้อ *B. bassiana* ให้เกษตรกร นักเรียน นิสิตนักศึกษา และหน่วยงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในด้านการควบคุมแมลงศัตรูพืช รวมทั้งศูนย์ถ่ายทอดเทคโนโลยีทางการเกษตรระดับท้องถิ่นโดยผ่านทางเอกสารแนะนำ รายการวิทยุ และโทรทัศน์ ระบบออนไลน์รวมทั้ง การสาธิต และฝึกอบรมของหน่วยงานเกี่ยวข้องในด้านการควบคุมแมลงศัตรูพืช รวมทั้งศูนย์ถ่ายทอดเทคโนโลยีทางการเกษตรระดับท้องถิ่น โดยการจัดทำรายงานการวิจัยในรูปเล่ม โปสเตอร์ เสนอผลงานในการประชุมวิชาการ ทางระบบออนไลน์ และการให้ข้อมูลแก่หน่วยงานที่สนใจเพื่อนำไปปฏิบัติและเผยแพร่ต่อไป