Evaluation Copy PDF Creator Plus 4.0

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่และระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้เริ่มดำเนินการตั้งแต่ มกราคม พ.ศ. 2549– มกราคม พ.ศ. 2550 รวมระยะเวลาประมาณ 1 ปี โดยมีสถานที่ทำการวิจัย ได้แก่ห้องปฏิบัติการโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต และพื้นที่ปลูกพืชผักวงศ์กะหล่ำ ในเขตตำบล โคกโคเฒ่า และตำบลใกล้เคียง ในอำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

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

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
3. Yeast Extract (Scharlau Chemie S.A. Barcelona, Spain Made in European Union)
3. Malt Extract Agar (MEA) Becton Dickinson Microbiolog systems Company, Spatks, MD 21152, USA
4. Beef Extract 3 g/litre Becton Dickinson Microbiolog systems Com pany, Spatks, MD 21152, USA

5. Peptone 5 (HiMedia Laboratories PVt. Ltd. Mumbai -400 086, India)

6. Agar (ผงวุ้น)

7. สารเคมีพื้นฐานที่ใช้ในการฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยา

3.4 วิธีการวิจัย

3.4.1 การเก็บรวบรวมข้อมูลจากแปลงเกษตรกร

เก็บตัวอย่างและข้อมูลเกี่ยวกับชนิดและประชากรของแมลงศัตรูพืชผักวงศ์กะหล่ำจากพื้นที่ปลูกพืชผักวงศ์กะหล่ำ ในเขตตำบลโคกโคเฒ่า และตำบลทัพระหัด (เนื่องจากบางจุดที่กำหนดไว้ในตำบลโคกโคเฒ่า เกษตรกรมีการเปลี่ยนแปลงชนิดของพืชปลูกเป็นพืชอย่างอื่นแทนพืชผักวงศ์กะหล่ำ) อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี ทุกสองเดือนตั้งแต่เดือน มกราคม พ.ศ. 2549 ถึง มกราคม พ.ศ. 2550 โดยทำการกำหนดขนาดแปลงปลูกที่ทำการเก็บข้อมูล เป็นพื้นที่ไม่น้อยกว่า 50 ตารางวาต่อจุด และทำการสุ่มนับจำนวนแมลงศัตรูพืช และเก็บตัวอย่างโรคแมลงจากต้นคะน้าหรือกะหล่ำแบบนับทั้งต้น จำนวน 50 ต้น ต่อจุด โดยแต่ละต้นอยู่ห่างกัน 5 ต้น รวมจำนวน 5 แปลงสำรวจ แบ่งเป็นส่วนที่มีการจัดการศัตรูพืชโดยใช้สารเคมี 2 สวน และแบบเกษตรอินทรีย์ 3 สวนแต่ละสวนจะตั้งอยู่ห่างกันไม่น้อยกว่า 3 กิโลเมตร แต่ไม่เกิน 10 กิโลเมตร บันทึกข้อมูลเป็นจำนวนรวมของแมลงศัตรูพืชแต่ละชนิด และ จำนวนรวมของแมลงที่เป็นโรคโดยการสังเกต การตายของแมลงในแปลงและ/หรือเก็บตัวอย่างแมลงที่มีอาการผิดปรกติแต่ยังไม่แสดงอาการชัดเจน ซึ่งมีวิธีการพิจารณาตามการอ้างอิงจากเอกสารของ กรมวิชาการเกษตร (2549) ดังนี้คือ

เชื้อรา: เกิดขึ้นได้กับทุกระยะของแมลง แมลงที่ตายจะแห้งและแข็ง ไม่อ่อนนุ่ม อาจพบไมซีเลียมหรือสปอร์ เจริญอยู่บนซากเหยื่อ ในการเก็บตัวอย่างจะ ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษทิชชูแล้วใส่ในกล่องพลาสติก

แบคทีเรีย: ส่วนใหญ่เกิดโรคกับแมลงระยะตัวอ่อนโดยเฉพาะหนอนของผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera ตัวอ่อนยังคงมีสีปกติจนกระทั่งตาย และเริ่มมีสีเข้ม หรือสีน้ำตาลดำ เน่าเหม็น ตัวอ่อนที่ตายมักจะอ่อนนุ่ม แต่ไม่เละ

Evaluation Copy
PDF Creator Plus 4.0

ไวรัส: โรคส่วนใหญ่เกิดขึ้นกับแมลงในระยะตัวอ่อน แมลงจะมีสีซีดและอ่อนนุ่มก่อนที่จะตาย และเปลี่ยนเป็นสีเข้ม หนอนที่ติดเชื้อบาคูโลไวรัส (baculoviruses) จะใช้ขาเทียมเกาะพืชไว้และห้อยหัวลงโดย มองเห็นเป็นรูปตัววีหัวกลับ และมักมีของเหลวสีขาวไหลเยิ้มออกมา

ไส้เดือนฝอย: สามารถเข้าทำลายแมลงได้ทุกระยะการเจริญเติบโต สามารถมองเห็นไส้เดือนฝอยผ่านผนังทางลำตัวของแมลงได้ หากเป็นไส้เดือนฝอยแรบดิติด (Rhabditid) ทำให้เหยื่อเปลี่ยน เป็นสีเทา เช่น สกุล *Steinernema* และสีแดงในสกุล *Heterorhabditis*

โปรโตซัว: ก่อโรคกับแมลงในทุกระยะ ระยะตัวอ่อนแมลงที่ติดเชื้อมักจะเจริญเติบโตช้า เชื่องซึมและล้มป่วย (แต่การตายมักเกิดจากสาเหตุอื่นหรือโรคแทรกซ้อน) ตัวเต็มวัยที่ติดเชื้อมักจะไม่ค่อยแสดงอาการ แต่อาจจะมีวงจรชีวิตสั้นลง และการวางไข่น้อยลง

3.4.2 การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

ทำการจำแนกลักษณะทั่วไป และจำแนกลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำลายแมลงโดยพิจารณาดังนี้

ไวรัส: ใส่แมลงที่เป็นโรคในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ทิ้งจนไวรัสอินคลูชั่นบอดี้ รวมตัวกันเป็นชั้นสีขาวที่ก้นหลอด แยกเอาของเหลวและซากแมลงรวมทั้งเซลล์แบคทีเรียออกนำไปปลูกเชื้อในแมลงอาศัยที่แข็งแรงปกติ (ใช้หนอนไหม *Bombyx mori*) เพื่อยืนยันการก่อโรค และตรวจเนื้อเยื่อของแมลง ใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้สีย้อม Giemsa stain จะพบอินคลูชั่นบอดี้ของออคคลูเด็ดไวรัส (NPVs) จะมีโครงสร้างสีขาวสะท้อนแสง ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราส และปรึกษาผู้เชี่ยวชาญเฉพาะ

แบคทีเรีย: จุ่มแมลงใน เอธานอล 2-3 วินาที แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 50 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 3-4 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ผ่าตัดแมลงโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ป้าย (streak) ส่วนประกอบของร่างกายแมลงลงบนอาหารวุ้น เก็บไว้ในอุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจหา คริสตัลไลน์พาราสปอรัลบอดี้ (crystalline parasporal body) และสปอร์ (spore) ใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายสูงสุด (oil immersion x 100) และจำแนกลักษณะตามเอกสาร Bergey' s Manual of determinative bacteriology (Holt, Krieg, Sneath, Staley and Williams , 2000, p. 125) และปรึกษาผู้เชี่ยวชาญ

Evaluation Copy PDF Creator Plus 4.0

เชื้อรา:ตรวจดูตัวอย่างของสปอร์และโครงสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากแมลงที่ตาย และการนำตัวอย่างที่เก็บจากแปลงเกษตรกรมา ทำ dilution plate technique ด้วยการนำเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา หรือส่วนสืบพันธุ์ต่าง ๆ ของเชื้อ (ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ)มาละลายในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเจือจางแบบเป็นชุดลดหลั่นตามความเข้มข้น (series) ให้ได้ความเข้มข้น 1×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำสารละลายดังกล่าวปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar หรือ Water Agar หรือ Sabouraud Dextrose Agar (ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ) และทำการบ่มในสภาพอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (20 -25 องศาเซลเซียส) จากนั้น 3-5 วัน เมื่อพบเชื้อรา ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีการต่าง ๆ ต่อไป และจำแนกชนิดของเชื้อโดยอาศัยเอกสารอ้างอิง (Pionar and Thomas 1984, p. 105; Tanada and Kaya, 1993, p. 114)

ไส้เดือนฝอย: ตรวจแมลงที่ตายเพื่อหาไส้เดือนฝอย โดยใช้เข็มและปากคีบในจานทดลองที่มีน้ำเล็กน้อยไส้เดือนฝอยจะออกจากซากแมลง เลือกไส้เดือนฝอยสำหรับตรวจและย้ายไปล้างทำความสะอาด ด้วยน้ำเกลือ เมื่อไส้เดือนฝอยหยุดนิ่ง เอาน้ำเกลือออก เติมน้ำยาสำหรับฟิกส์ซึ่งร้อนประมาณ 55 องศาเซลเซียส ทำสไลด์ถาวร จากสารละลายที่ประกอบด้วย เอธานอล 96 เปอร์เซ็นต์ 20 ส่วน น้ำกลั่น 79 ส่วน และกลีเซอรัล 1 ส่วน ย้ายไส้เดือนฝอยที่ฟิกส์แล้วลงในสารละลาย และทิ้งไว้ 1 วันเปลี่ยนสารละลายเป็นกลีเซอรัล 5 ส่วน และเอธานอล 96 เปอร์เซ็นต์ 95 ส่วน ปล่อยให้ระเหยอย่างช้าๆ และปิดสไลด์ด้วยน้ำยาเคลือบเล็บ เพื่อใช้เก็บอย่างถาวรสำหรับอ้างอิงและจำแนกชนิด ตามเอกสารอ้างอิง (Pionar and Thomas 1984, p. 235) และปรึกษาผู้เชี่ยวชาญต่อไป

หลังจากสำรวจรวบรวมและจำแนกชนิดของแมลงศัตรูและเชื้อโรคแล้วนำข้อมูลจำนวนเฉลี่ยของแมลงศัตรูพืชแต่ละชนิด จำนวนของแมลงศัตรูพืชแต่ละชนิดที่เป็นโรค จาก นั้นเก็บรวบรวมข้อมูลแต่ละครั้งของการสำรวจรวม 6 ครั้ง ครั้งละสองเดือน ทำการวิเคราะห์ นิเวศวิทยาประชากรของแมลงศัตรูพืชผักวงศ์กะหล่ำ โดยพล๊อตกราฟที่มีแกนตั้งเป็นจำนวนแมลงและแกนนอนเป็นเวลา นำข้อมูลดังกล่าวไปหาเปอร์เซ็นต์การทำลายของเชื้อโรคของแมลง เพื่อเป็นการอธิบายถึงศักยภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ของเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การทำลายของเชื้อโรคของแมลง} = \frac{\text{จำนวนแมลงที่เป็นโรค} \times 100}{\text{จำนวนแมลงทั้งหมด}}$$

Evaluation Copy
PDF Creator Plus 4.0

3.4.3 การศึกษาเทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชผักวงศ์กะหล่ำ

ศึกษาวิธีการแยกเชื้อที่เหมาะสมในการแยกเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด ทั้งนี้ในกรณีของเชื้อไวรัส แบคทีเรีย โปรโตซัว และไส้เดือนฝอยได้มีวิธีมาตรฐานในการแยกตามเอกสารอ้างอิงต่าง ๆ และส่วนมากได้มีการผลิตและใช้ประโยชน์ในรูปยาเชื้อแล้ว จึงได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเพื่อการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการควบคุมประชากรของแมลงศัตรูพืช ในฐานะส่วนหนึ่งของจุลินทรีย์ ดังนั้นการศึกษาจึงเน้นไปที่เชื้อรา โดยคัดเลือกวิธีการที่เหมาะสมในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ต่อเชื้อราแต่ละชนิด ได้แก่ single spore isolation แบบ streak plate technique, single spore isolation แบบ dilution plate technique ที่ความเข้มข้น 10^3 สปอร์ต่อมิลลิลิตร single spore isolation แบบ dilution plate technique ที่ความเข้มข้น 10 สปอร์ต่อมิลลิลิตร tissue transplanting technique และ การทำ spore descent isolation ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Agar Supplemented with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA), Nutrient Agar (NA) และ Water Agar (WA) ทำการเปรียบเทียบอัตราการพบ single colony ต่อการปนเปื้อน มีจัดรูปแบบของวิธีทดลองแบบแฟกทอเรียลในการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) ซึ่งมีชนิดของอาหารและวิธีการแยกเชื้อเป็นปัจจัยหลัก โดยมีการทำซ้ำวิธีการทดลองละ 4 ซ้ำ และการวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์และหากพบนัยสำคัญ ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ศึกษาชนิดของอาหารเทียมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีและปริมาณการสร้างหน่วยสืบพันธุ์ (spores) ของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ได้แก่ PDA SDA SDAY MEA NA และ WA โดยมีการวางเชื้อราบริสุทธิที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.05 เซนติเมตร ตรงกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารที่ใช้ทดสอบ 20 มิลลิลิตร จำนวนสี่จานเพาะเลี้ยงเชื้อต่อเชื้อหนึ่งชนิด โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำการวัดการเจริญของโคโลนีของเชื้อทุก 3 วัน และเป็นเวลา 1 ถึง 2 สัปดาห์ขึ้นกับชนิดของเชื้อ จนเชื้อเจริญครบ 8 เซนติเมตร และคำนวณอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของเชื้อต่อวันจาก สูตร

Evaluation Copy PDF Creator Plus 4.0

อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของเชื้อต่อวัน = ผลรวมระยะทางที่เชื้อเจริญแต่ละครั้งของการวัด / จำนวนครั้งที่วัด

นำข้อมูลไปหาค่าเฉลี่ยการเจริญ การทดลองมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีการทำซ้ำวิธีการทดลองละ 4 ซ้ำ และการวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ และหากพบนัยสำคัญ ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่พบ โดยการประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมด้วงหมัดผักซึ่งเป็นแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญ โดยทำการเลี้ยงแมลงที่จะทำการทดสอบบนกะหล่ำในกระถาง และมีการให้น้ำและปุ๋ยตามขบวนการที่เกษตรกรใช้ แต่ไม่มีการใช้สารเคมี และนำแมลงที่ไม่เป็นโรคซึ่งเก็บได้จากแปลงเกษตรกรมาเลี้ยงโดยใช้พืชที่เตรียมไว้ โดยให้แมลงมีการขยายพันธุ์จนได้รุ่นลูก (generation) ประมาณ 2-3 รุ่น เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นแมลงที่ไม่มีการติดเชื้อ (ปลอดโรค) จากการทดสอบพ่นสารละลายสปอร์ของเชื้อที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรกับแมลง จำนวน 30 ตัวต่อซ้ำ จำนวน 4 ซ้ำ (Poinar and Thomas, 1984, pp.105) โดยมีวิธีการทดลองคือ การปลูกเชื้อที่ความเข้มข้นของสปอร์จำนวน 5 ระดับความเข้มข้น (ขึ้นกับชนิดของเชื้อและปริมาณการสร้างสปอร์) เปรียบเทียบกับวิธีการที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (control) มีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ขึ้นกับชนิดและขนาดของแมลง จากนั้นนำแมลงที่ได้รับการทดสอบไปเลี้ยงต่อในสภาพที่มีการให้อาหารเป็นปรกติ และสังเกตอาการของแมลงและหาเปอร์เซ็นต์การทำลายโดยนับจำนวนแมลงที่ตาย

ศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้เป็นประจำในพื้นที่และสามารถทำลายแมลงได้หลายชนิด (Butt, Jackson and Magan, 2001, p.23; Copping, 2001 , p. 85 ; Tanada and Kaya, 1993, p. 554) ในวัสดุเพาะที่สามารถหาได้ในท้องถิ่นได้แก่ อาหารปลาสำเร็จรูป อาหารสุนัขสำเร็จรูป อาหารไก่สำเร็จรูปแบบอัดเม็ด ข้าวสารหักหนึ่งสุก เมล็ดข้าวเปลือกนึ่งสุก เมล็ดข้าวฟ่างหนึ่งสุก และ เมล็ดข้าวโพดบดนึ่งสุก ทำการปลูกเชื้อราที่เลี้ยงในอาหาร SDA อายุ 7 วัน ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.05 เซนติเมตร ลงในวัสดุเพาะที่เตรียมไว้ในขวดทดลอง ขนาด 200 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุวัสดุเพาะ 150 กรัม บ่มใน

Evaluation Copy
PDF Creator Plus 4.0

สภาพอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 – 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน และวัดผลโดยการประเมินสัดส่วนการเจริญเติบโตของเส้นใย สัดส่วนการสร้างสปอร์ของเชื้อในวัสดุเพาะ และความเข้มข้นของสปอร์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีการทำซ้ำ วิธีการทดลองละ 3 ซ้ำเผยแพร่ผลงานวิจัยข้อมูลต่างๆ ได้แก่ผลการศึกษาในแปลงเกษตรกร และในห้องปฏิบัติการจะมีการเผยแพร่ผ่านทางผลงานทางเอกสารวิชาการ ในการประชุมวิชาการ วารสารวิชาการและทางระบบออนไลน์เพื่อให้เกิด ความรู้ ความเข้าใจแก่ นักวิจัย เกษตรกร และหน่วยงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในด้านการควบคุมแมลงศัตรูผักวงศ์กะหล่ำในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี

Evaluation Copy
PDF Creator Plus 4.0