ผลของแบคทีเรียสาเหตุโรคแมลง *Xenorhabdus nematophilus* ในเหยื่อโปรตีนต่อตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) และแมลงช้างปีกใส *Mallada basalis* (Walker) (Neuroptera: Chrysopidae)

Effect of Entomopathogenic Bacterium *Xenorhabdus nematophilus* in Protein Bait on Adult of Fruit Fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) and Lacewing *Mallada basalis* (Walker) (Neuroptera: Chrysopidae)

เอื้อมพร อุยยะพัฒน์

Aermporn Uiyapat

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากีฏวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Entomology
Prince of Songkla University

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผลของแบคทีเรียสาเหตุโรคแมลง *Xenorhabdus nematophilus* ในเหยื่อโปรตีนต่อตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) และแมลงช้างปีกใส *Mallada basalis* (Walker) (Neuroptera: Chrysopidae)

Effect of Entomopathogenic Bacterium *Xenorhabdus nematophilus* in Protein Bait on Adult of Fruit Fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) and Lacewing *Mallada basalis* (Walker) (Neuroptera: Chrysopidae)

เอื้อมพร อุยยะพัฒน์

Aermporn Uiyapat

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากีฏวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Entomology
Prince of Songkla University

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของแบคทีเรียสาเหตุโรคแมลง *Xenorhabdus nematophilus* ในเหยื่อโปรตีนต่อตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) และ แมลงช้างปีกใส *Mallada basalis* (Walker) (Neuroptera: Chrysopidae)

ผู้เขียน นางสาวเอื้อมพร อุยยะพัฒน์

สาขาวิชา กีฏวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….....

(รองศาสตราจารย์ ดร. จิราพร เพชรรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

…….....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

คณะกรรมการสอบ

…...…...……...……ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ งามผ่องใส)

……กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.จิราพร เพชรรัตน์)

……กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ดร.ประเสริฐ สันตินาเลิศ)

……กรรมการ

(ดร. จารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากีฏวิทยา

…….....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ…….....
(รองศาสตราจารย์ ดร. จิราพร เพชรรัตน์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ…….....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ…….....
(นางสาวเอื้อมพร อุยยะพัฒน์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวเอื้อมพร อุยยะพัฒน์)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของแบคทีเรียสาเหตุโรคแมลง *Xenorhabdus nematophilus* ในเหยื่อโปรตีนต่อตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) และ แมลงช้างปีกใส *Mallada basalis* (Walker) (Neuroptera: Chrysopidae)

ผู้เขียน นางสาวเอื้อมพร อุยยะพัฒน์

สาขาวิชา กีฏวิทยา

ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

แมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* เป็นแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญของผลไม้และผักหลายชนิด หนึ่งในวิธีการป้องกันและการกำจัดแมลงวันผลไม้คือการใช้เหยื่อล่อโปรตีนที่มีความเป็นพิษ การศึกษาครั้งนี้ใช้เหยื่อล่อโปรตีนร่วมกับจุลินทรีย์คือ แบคทีเรียสาเหตุโรคแมลง *Xenorhabdus nematophilus* พบว่าเมื่อแมลงวันผลไม้ได้รับ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้น 100,000 ppm (ml/10^3L) (10 เปอร์เซ็นต์ หรือ 9.01×10^7 CFU/ml) ปริมาณ 30 มิลลิลิตร โดยวิธีการกิน หลังจากนั้น 48 ชั่วโมง ตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 51.25±6.29 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวมาผสมกับเหยื่อล่อโปรตีน yeast hydrolysate ปริมาณ 0.50 กรัม พบว่าสามารถดึงดูดให้แมลงวันผลไม้ให้เข้าหาเหยื่อพิษได้ดีและมีผลทำให้มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 100.00±0.00 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบระยะเวลาการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ในเหยื่อล่อโปรตีน yeast hydrolysate ในธรรมชาติ พบว่าการฉีดพ่นแล้วปล่อยให้แมลงวันผลไม้เข้าทำลายทันทีให้ผลในการควบคุมดีที่สุด โดยสามารถทำให้ตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 99.75±0.50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อระยะเวลาผ่านไปประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ในเหยื่อล่อโปรตีน yeast hydrolysate ก็ลดลงตามไปด้วย นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรีย *X. nematophilus* ในเหยื่อล่อโปรตีน yeast hydrolysate ไม่มีผลต่อแมลงช้างปีกใส *Malada basalis* ซึ่งเป็นแมลงศัตรูธรรมชาติที่สามารถพบได้ทั่วไปในแปลงปลูก ดังนั้นแบคทีเรีย *X. nematophilus* ในเหยื่อล่อโปรตีน

yeast hydrolysate จึงมีผลกระทบต่อแมลงที่มีประโยชน์ต่ำแต่มีประสิทธิภาพในการควบคุมตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้สูง แต่อาจจะต้องทำการเปลี่ยนเหยื่อล่อบ่อยเพื่อให้มีความต่อเนื่องในการควบคุม

Thesis Title	Effect of Entomopathogenic Bacterium *Xenorhabdus nematophilus* in Protein Bait on Adult Fruit Fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) and Lacewing *Mallada basalis* (Walker) (Neuroptera: Chrysopidae)
Author	Miss Aermporn Uiyapat
Major Program	Entomology
Academic Year	2015

Abstract

Oriental fruit fly *(Bactrocera dorsalis*) is a very destructive pest of fruit and vegetables. One of the preventive and control methods is using poisonous protein baits. In this studies, the effects of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* (which have been grown for 48 hours, at 100,000 ppm (ml/10^3L) (10 percent or 9.01×10^7 CFU/ml)) on adult *B. dorsalis* and the natural enermy lacewing *Mallada basalis* were investigated. After 48 hours the death rate of adult oriental fruit flies is equal to 51.25±6.29 percent. When mixing cell solution of bacteria *X. nematophilus* at such concentration level with 0.50 grams of protein bait yeast hydrolysate, it is found that the oriental fruit flies are easily attracted to poisonous bait, which led to the death rate of 100.00±0.00 percent. When testing duration of action of bacteria *X. nematophilus* in protein baits yeast hydrolysate in nature, it is found that spraying and letting oriental fruit flies immediate destroy is the most effective control method, which results in the death rate of adult oriental fruit flies at 99.75±0.50 percent within 48 hours. When the time has passed, effectiveness of action of bacteria *X. nematophilus* in protein baits yeast hydrolysate has also decreased. In addition, it is found that bacteria *X. nematophilus* in protein baits yeast hydrolysate has no effect on green lacewings (*Malada basalis*), which are natural pest normally found in nature. Therefore, bacteria *X. nematophilus* in protein baits yeast hydrolysate has low effects on useful flies but high effectiveness of adult oriental fruit fly control. However, changing baits often is recommended for continuous control.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จิราพร เพชรรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา แก้ไขข้อบกพร้อม ชี้แนะแนวทาง ในการค้นคว้าวิจัยทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อรัญงาม ผ่องใส ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำเกี่ยวกับการคำนวนหาค่า LC_{50} และ LC_{95} ด้วยวิธีโพรบิท (Probit analysis)

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ที่กรุณาถ่ายทอดความรู้และคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบพระคุณภาควิชาการจัดการศัตรูพืช และศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติภาคใต้ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณพี่ปัทมพร อินสุวรรโณ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาการจัดการศัตรูพืชทุกท่านที่ให้บริการอย่างเต็มที่และรวดเร็ว

ขอขอบพระคุณพี่ยาวารีย๊ะ สาเมาะ พี่สายฝน แซ่ตัน และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติภาคใต้ทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือในการทำวิจัยอย่างเต็มที่

ขอขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ ตลอดจนพี่น้องที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจเสมอมา

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชากีฏวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่านที่ได้ร่วมเรียน ร่วมฝ่าฟันอุปสรรค และเป็นกำลังใจให้กันเสมอมา ขอมอบคุณความดี และประโยชน์ทั้งหลายที่เกิดจากการทำวิจัยครั้งนี้แด่ทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอื้อมพร อุยยะพัฒน์

สารบัญ

บทคัดย่อ ..... **(5)**

Abstract ..... **(7)**

กิตติกรรมประกาศ ..... **(8)**

สารบัญ ..... **(9)**

สารบัญภาพ ..... **(10)**

สารบัญตาราง ..... **(11)**

สารบัญตาราง (ต่อ) ..... **(12)**

บทที่ 1 บทนำ **1**

บทนำต้นเรื่อง 1

การตรวจเอกสาร 2

วัตถุประสงค์ 17

บทที่ 2 วิธีการวิจัย **18**

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการ 18

บทที่ 3 ผลและบทวิจารณ์ **33**

บทที่ 4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ **62**

เอกสารอ้างอิง **64**

ภาคผนวก **70**

ประวัติผู้เขียน **78**

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดงแบคทีเรียอาศัยอยู่บริเวณทางเดินอาหารของไส้เดือนฝอย 3
ภาพที่ 2 แสดงวัฐจักรชีวิตของแบคทีเรียสาเหตุโรคของแมลง *Xenorhabdus nematophilus* 4
ภาพที่ 3 วัฏจักรชีวิตของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel).....11
ภาพที่ 4 วัฏจักรชีวิตของแมลงช้างปีกใส *Mallada basalis* (Walker) 16
ภาพที่ 5 โคโลนีแบคทีเรีย *X. nematophilus* มีสีน้ำเงินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA ที่ 48 ชั่วโมง....34
ภาพที่ 6 โคโลนีแบคทีเรีย *X. nematophilus* มีสีเทาครีมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ 48 ชั่วโมง.....34
ภาพที่ 7 ลักษณะเซลล์แบคทีเรีย *X. nematophilus* จากการย้อมแกรมเป็นแกรมลบ รูปแท่ง (กำลังขยาย 100X).....35
ภาพที่ 8 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้.....38
ภาพที่ 9 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสง และจำนวน log เซลล์แบคทีเรีย *X. nematophilus* ในช่วงเวลาต่างๆ.....41
ภาพที่ 10 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่ตายจากการได้รับเชื้อ แบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกัน โดยวิธี cell solution และ cell free filtrates ของแบคทีเรีย 43
ภาพที่ 11 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การตายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เพศผู้และเพศเมียที่ตายจากการได้รับ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกัน 45
ภาพที่ 12 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การตายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis*เพศผู้และเพศเมียที่ตายจากการได้รับ cell free filtrate ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกัน 45
ภาพที่ 13 เปรียบเทียบซากแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่ตายจากการติดเชื้อและไม่ติด เชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* (กำลังขยาย 3X) 60
ภาพที่ 14 โคโลนีของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่แยกได้จากซากแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis*.....61

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์แบบเฉพาะเจาะจงของไส้เดือนฝอยกับชนิดของแบคทีเรียอาศัยร่วม 2

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้ 36

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและการตรวจนับโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhadus nematophilus* ในช่วงเวลาต่างๆ 40

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* ที่ตายจากการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกัน โดยวิธี cell solution และ cell free filtrates ของแบคทีเรีย 42

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การตายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เพศผู้และเพศเมียที่ตายจากการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกัน โดยวิธี cell solution และ cell free filtrates ของแบคทีเรีย 44

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การตายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เพศผู้และเพศเมียที่ตายจากการได้รับ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกัน 46

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การตายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เพศผู้และเพศเมียที่ตายจากการได้รับ Cell free filtrates ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกัน 47

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นการตายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่ตายจากการได้รับ cell solution และ cell free filtrate ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน.....50

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นการตายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่ตายจากการได้รับ cell solution และ cell free filtrate ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน.....51

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นการตายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่ตายจากการได้รับ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ผสมกับ yeast hydrolysate 53

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นการตายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และแมลงช้างปีกใส *Malada basalis* ที่ตายจากการได้รับ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ในเหยื่อโปรตีน yeast hydrolysate 55

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่ตายจากการได้รับพิษตกค้างของ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ผสมกับ yeast hydrolysate บนผลฝรั่ง 57

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบจำนวนตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่ได้จากการทดสอบพิษตกค้างของ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ผสมกับ yeast hydrolysate 58

ตารางที่ 14 แสดงเปอร์เซ็นต์การเข้าดักแด้ และเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่ได้จากการทดสอบพิษตกค้างของ cell solution ของแบคทีเรีย *X.nematophilus* ผสมกับ yeast hydrolysate 59

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

แมลงวันผลไม้เป็นแมลงศัตรูสำคัญของไม้ผลและผักหลายชนิด การป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้สามารถทำได้หลายวิธีทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อให้สามารถเลือกใช้ได้ตามความเหมาะสมและถูกช่วงเวลาเพื่อการกำจัดแมลงวันผลไม้ให้ได้ผลดีทั้งวิธีการทางเขตกรรม การใช้สารเคมี การใช้วิธีทางฟิสิกส์และพันธุศาสตร์เป็นต้น และจากความรู้ว่าตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ทั้งเพศผู้และเพศเมียต้องการอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลและโปรตีนในการดำรงชีพและขยายพันธุ์ โดยเฉพาะเพศเมียต้องได้รับโปรตีนก่อนที่ไข่จะเจริญเติบโตเต็มที่ ทำให้มีการนำเหยื่อโปรตีน (protein bait) ที่มีส่วนผสมของโปรตีน น้ำตาล และสารฆ่าแมลงที่ออกฤทธิ์โดยการกิน (stomach poison) มาใช้ควบคุมแมลงวันผลไม้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1889 (UH-CTAHR, n.d.) เหยื่อโปรตีนจะดึงดูดตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ให้เข้ามากินและได้รับสารฆ่าแมลงทำให้แมลงวันผลไม้ตายก่อนที่จะพร้อมผสมพันธุ์และวางไข่ การควบคุมโดยใช้เหยื่อโปรตีนทำโดยการฉีดพ่นหรือวาง เหยื่อโปรตีนเป็นจุดๆทำให้ใช้สารฆ่าแมลงน้อยลงเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและเกษตรกรน้อยลง (Anonymous, 2002; UH-CTAHR, n.d.) ในประเทศไทยการใช้เหยื่อโปรตีนได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีการควบคุมแมลงวันผลไม้ที่มีประสิทธิภาพเหมาะกับการใช้ในการจัดการแมลงวันผลไม้ (มนตรี, 2533 อ้างโดยสัญญาณี และคณะ, มปป.; Megsongsee *et al.*, 1988) กรมส่งเสริมการเกษตรแนะนำการกำจัดแมลงวันผลไม้โดยการใช้เหยื่อโปรตีนผสมสารฆ่าแมลงคือมาลาไธออน อย่างไรก็ดีเนื่องจากความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ของเหยื่อโปรตีนจะขึ้นอยู่กับสารฆ่าแมลงที่ใช้และปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าจุลินทรีย์เชื้อโรคแมลงหลายชนิดมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยสูงในการควบคุมแมลง จึงได้ศึกษาผลของแบคทีเรียเชื้อโรคแมลง *Xenorhabdus nematophilus* และการใช้แบคทีเรียชนิดนี้ในเหยื่อโปรตีนต่อแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* และแมลงช้างปีกใส *Mallada basalis* เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพิจารณานำแบคทีเรีย *X. nematophilus* มาเป็นสารฆ่าแมลงร่วมกับเหยื่อโปรตีนเพื่อควบคุมแมลงวันผลไม้ต่อไป

การตรวจเอกสาร

แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*

แบคทีเรียในสกุล *Xenorhabdus* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* spp. ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยที่มีศักยภาพสูงในการทำลายแมลงศัตรูพืชได้มากกว่า 200 ชนิด และมีการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างกว้างขวางทั่วโลก โดยแบคทีเรียกับไส้เดือนฝอยมีความสัมพันธ์แบบเกื้อกูลกัน (symbiosis) ไส้เดือนฝอย *Steinernema* ได้รับการรับรองจาก The United States Environmental Protection Agency (USEPA) ถึงความปลอดภัยต่อพืชและสัตว์เลือดอุ่นรวมถึงสภาพแวดล้อม (Gaugler and Kaya, 1990) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะเข้าหาแมลงที่เป็นเหยื่อและเจาะไชผ่านผนังลำตัวแมลงหรือกระเพาะอาหารของแมลงเข้าสู่ช่องโลหิต (haemocoel) แล้วปล่อยแบคทีเรียออกมา ทำให้แมลงตายอย่างรวดเร็วจากพิษของแบคทีเรียและไส้เดือนฝอย (Akhurst and Dunphy, 1993) Akhurst and Boemare (1990) รายงานว่า ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแต่ละชนิดมีความสัมพันธ์แบบเฉพาะเจาะจงกับชนิดของแบคทีเรียอาศัยร่วม แต่แบคทีเรียอาศัยร่วมอาจมีความสัมพันธ์กับไส้เดือนฝอยได้มากกว่า 1 ชนิด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์แบบเฉพาะเจาะจงของไส้เดือนฝอยกับชนิดของแบคทีเรียอาศัยร่วม

แบคทีเรียร่วมอาศัย	ไส้เดือนฝอยเชื้อโรคแมลง
Xenorhabdus nematophilus	*Steinernema carpocapsae*
	S. glaseri
X. poinarii	*S. feltiae*
X. bovienii	*S. krausseri*
X. bovienii	*S. intermedia*
X. bovienii	*S. rarai*
Xenorhabdus sp.	*S. anomali*
Xenorhabdus sp.	*Steinernema* sp.
X. beddingii	*Heterorhabditis.* spp.
Photorhabdus luminescens	

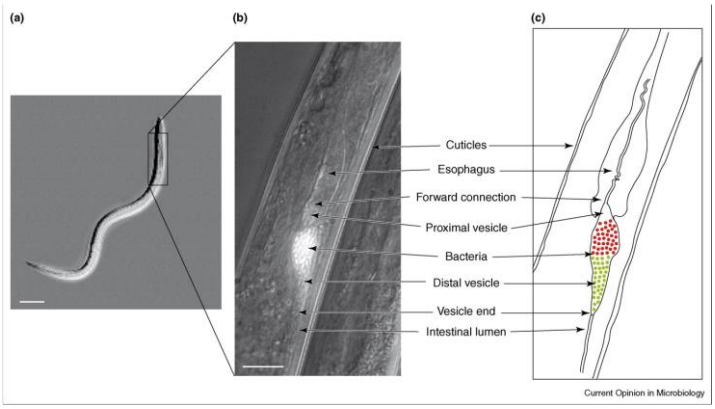
ที่มา **:** Akhurst and Boemare (1990)

แบคทีเรียในสกุล *Xenorhabdus* จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae Tailliez *et al.* (2010) อ้างโดย Thanwisai *et al.* (2012) รายงานว่ามีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 21 สายพันธุ์ ที่มีความสัมพันธ์กับไส้เดือนฝอย *Steinernema*

ปัจจุบันมีการศึกษาการนำแบคทีเรีย *X. nematophilus* มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ เพื่อเป็นจุลินทรีย์ทางเลือกใหม่ในการนำมาใช้ประโยชน์ในทางการเกษตร

ชีววิทยาของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*

Xenorhabdus nematophilus อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae สกุล *Xenorhabdus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง เคลื่อนที่ได้ มีแฟลกเจลลาแบบรอบตัว (peritrichously flagellar) เจริญได้ในสภาพไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียอาศัยร่วม (symbiotic bacteria) กับไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (infective juvenile) โดยแบคทีเรีย *X. nematophilus* อาศัยอยู่ในลำไส้ส่วนบนของไส้เดือนฝอย (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงแบคทีเรียอาศัยอยู่บริเวณทางเดินอาหารของไส้เดือนฝอย

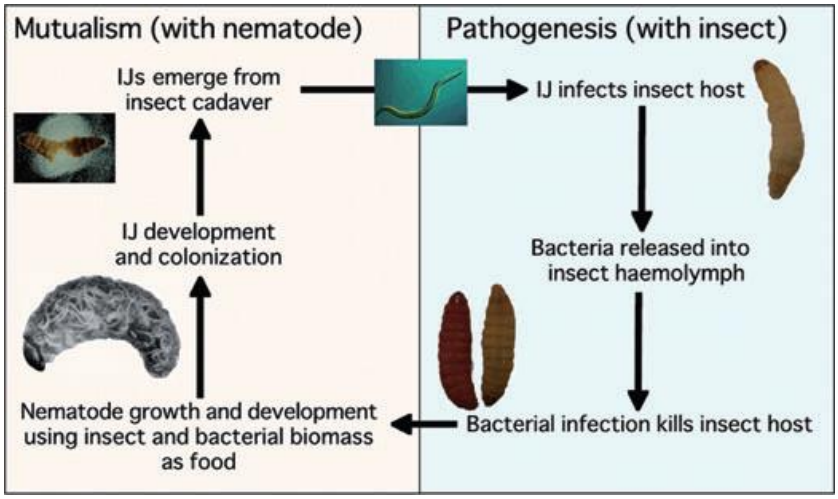
(a) ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ระยะตัวอ่อน

(b) แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ในลำไส้ส่วนบนของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae*

(c) ภาพวาดแสดงแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ในลำไส้ส่วนบนของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae*

ที่มา : Goodrich-Blair (2007)

เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าสู่ภายในลำตัวแมลงทางปาก ทวารหรือรูหายใจ ไส้เดือนฝอยจะปล่อยแบคทีเรียออกจากทางเดินอาหารเข้าสู่ช่องโลหิตของแมลง และไส้เดือนฝอยจะเจริญเติบโตต่อไปโดยการลอกคราบเป็นตัวอ่อนวัยที่ 4 และเป็นตัวเต็มวัย หลังจากนั้นเมื่อมีการผสมพันธุ์กัน เพศเมียวางจะไข่ ซึ่งเมื่อไข่ฟักจะเจริญเป็นตัวอ่อนวัยที่ 1 และวัยที่ 2 ในช่วงปลายของวัยที่ 2 ไส้เดือนฝอยหยุดกินอาหาร และกักเก็บแบคทีเรียไว้ในลำไส้จากนั้นจึงลอกคราบเป็นตัวอ่อนวัยที่ 3 เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าสู่ระยะตัวอ่อนวัยที่ 3 จะออกหาแมลงอาศัยตัวใหม่ต่อไป (Lacey, 1997) การทำงานร่วมกันของไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียทำให้แมลงเกิดสภาวะเลือดเป็นพิษทำให้แมลงตายภายใน 48 ชั่วโมง (Mahar *et al.*, 2008) ไส้เดือนฝอยมีการพัฒนาอยู่ภายในซากของแมลงต่อไปอีก 2-3 รุ่น จึงออกจากซากของแมลงเพื่อไปหาแมลงอาศัยใหม่ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงวัฐจักรชีวิตของแบคทีเรียสาเหตุโรคของแมลง *Xenorhabdus nematophilus*

ที่มา : Goodrich-Blair และ Clarke (2007)

จากการศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร nutrient agar แบคทีเรีย *X. nematophilus* มีการเจริญ 2 แบบคือ แบคทีเรีย phase 1 มีลักษณะโคโลนีสีแดง ชมพูใสๆ หรือแดงอมน้ำตาล โคโลนีรูปร่างกลมขอบไม่เรียบ นูนโค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร ผิวหน้าโคโลนีเป็นเม็ดๆ โคโลนีทึบแสง ในระยะนี้เซลล์จะมีการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) มีการผลิตเอนไซม์ lipase, phospholipase และ protease ส่วนแบคทีเรีย phase 2 จะมีขนาดโคโลนีใหญ่กว่าโคโลนี phase 1 สีของโคโลนีมีสีเหลืองอ่อน น้ำตาลหรือเทาขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ขอบไม่เรียบ แบนราบไปตามผิวหน้าอาหาร ผิวหน้าโคโลนีเป็นเม็ดๆ โคโลนีไม่ทึบแสง โดยยอมให้แสง

ผ่านได้บ้าง (Akhurst, 1983 ; Boemare and Akhurst, 1988) เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของแบคทีเรีย phase 1 และ phase 2 พบว่า ในแบคทีเรีย phase 1 โคโลนีมีความหนืด และเกิด clear zone จากการทดสอบการสร้าง antibiotic และให้โคโลนีสีน้ำเงินบนอาหาร Nutrient agar containing bromothymol blue and triphenyltetrazolium chloride (NBTA) ส่วนแบคทีเรีย phase 2 ให้ผลลบในการทดสอบดังกล่าว การแยกเชื้อและการจัดจำแนกเบื้องต้นใช้ลักษณะโคโลนีบนอาหารชนิดต่างๆ ในการตรวจหาเชื้อ และเนื่องจากแบคทีเรียสกุลนี้มี 2 phase ทำให้ประสบปัญหาในการจัดจำแนกโดยใช้วิธีทางชีวเคมี และในปัจจุบันได้มีการนำ การวิเคราะห์ DNA มาช่วยในการจัดจำแนกซึ่ง Brunel *et al.* (1997) รายงานว่าไม่มีความแตกต่างกันของลำดับเบสบน DNA ระหว่างแบคทีเรีย phase 1 และ phase 2 Forst *et al.* (1997) พบว่า เซลล์แบคทีเรีย *X. nematophilus* ใน phase 1 ผลิตเอนไซม์ chitinase มากกว่าเซลล์แบคทีเรียใน phase 2 แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียทั้งสอง phase มีความสามารถในการก่อโรคในหนอนกินไขผึ้งและหนอนกระทู้ผักคล้ายๆกัน

กลไกการก่อโรคโดยแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*

ตัวไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไม่ใช่สาเหตุการตายของแมลงอาศัยโดยตรงนอกจากมีจำนวนมากจริงๆเท่านั้น สาเหตุการตายที่แท้จริงเกิดจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้ของไส้เดือนฝอยทำหน้าที่ในการฆ่าแมลง ดังนั้นแบคทีเรีย *X. nematophilus* จึงมีความสำคัญและเป็นปัจจัยหลักในการทำให้แมลงตาย แบคทีเรียชนิดนี้จึงถูกจัดเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคกับแมลง (entomopathogenic bacteria) (ประภัสสร, 2554)

แบคทีเรียเมื่อเข้าสู่ตัวแมลงโดยมีไส้เดือนฝอยเป็นพาหะผ่านทางช่องเปิดต่างๆ เช่น ปาก ทวารหนัก รูหายใจ ท่อหายใจ หรือเจาะทะลุผ่านเข้าทางผนังลำตัวของแมลง แบคทีเรียจะถูกปลดปล่อยสู่กระแสเลือดของแมลงและมีการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว แบคทีเรียสร้างและปล่อยสารที่มีความเป็นพิษต่อระบบเลือดของแมลงออกมาทำให้แมลงเกิดอาการโลหิตเป็นพิษ (toxemia) และตายอย่างรวดเร็วภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง สารดังกล่าวได้แก่ สารปฏิชีวนะ (antibiotic) เอนไซม์ lipase, phospholipase และ protease (Akhurst, 1983; Boemare and Akhurst, 1988) ซึ่งปกติแมลงสามารถตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียโดยสร้างภูมิคุ้มกันแบบที่เป็นของเหลว (humoral immune response) และภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ (cellular immune response) ซึ่งภูมิคุ้มกันในระดับเซลล์นั้นเป็นการตอบสนองอย่างเฉียบพลันมีทั้งการกลืนกิน (phagocytosis) และ

nudulation อย่างไรก็ดีแม้การป้องกันตัวเองจะสามารถช่วยคุ้มครองแมลงจากผู้บุกรุกหลายชนิดแต่จุลินทรีย์บางชนิดรวมทั้ง *Xenorhabdus spp.* มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคสูงและสามารถเอาชนะภูมิคุ้มกันที่แมลงสืบทอดทางกรรมพันธุ์ (innate immune reactions) (Shrestha and Kim, 2007; Ratcliffe and Rowley, 2009) ดังเช่นแบคทีเรีย *X. nematophilus* เอนไซม์ phospholipase ที่แบคทีเรียปล่อยออกมาจะไปยับยั้งการสังเคราะห์ eicosanoid ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญมีความเกี่ยวข้องในการเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่ทำให้เกิดกระบวนการ phagocytosis ของแมลงตัวให้อาศัยทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของแมลงไม่สามารถทนต่อความเป็นพิษที่เพิ่มมากขึ้นได้ แบคทีเรียจึงสามารถกระจายไปตามกระแสเลือดและไปเกาะอยู่ตามส่วนต่างๆ ที่เป็นเนื้อเยื่อทำให้แมลงเกิดอาการโลหิตเป็นพิษและตายอย่างรวดเร็ว (Dunphy and Webster,1984 และ Park and Kim, 2000 อ้างถึงใน Shrestha and Kim, 2007) นอกจากนี้เอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ยังทำหน้าที่ในการย่อยเนื้อเยื่อของแมลงอาศัยให้มีโมเลกุลเล็กลงเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารของไส้เดือนฝอยภายในตัวแมลง (Akhurst and Boemare, 1990) Wang *et al.* (2012) แยกโปรตีนคอมเพล็กซ์ (Xnpt) ซึ่งประกอบด้วยโพลีแพพไทด์ 7 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 50-250 กิโลดาลตัน โดย Xnpt มีความรุนแรงสูงสุดต่อหนอนใยผัก *Plutella xylostella* เมื่อได้รับทางปากโดยมี LC_{50} ที่ 72 ชั่วโมง ต่อหนอนวัย 2 และ 3 เท่ากับ 331.45 ng/ml และ 553.59 ng/ml ตามลำดับ และจากการศึกษาพบว่า Xnpt ทำลายเนื้อเยื่อทางเดินอาหารส่วนกลางทำให้แมลงไม้อยากกินอาหารและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ protease แบคทีเรีย *X. nematophilus* ยังสังเคราะห์และปล่อยสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างและสารอื่นๆ ที่ทำให้เกิดสภาวะ “monogenia condition” ซึ่งช่วยให้ไส้เดือนฝอยมีการเจริญเติบโตดี ทำให้ซากแมลงไม่เน่าเปื่อย แมลงที่ตายจากการถูกแบคทีเรีย *X. nematophilus* เข้าทำลายมีลักษณะพิเศษ คือไม่เน่า ผิวของแมลงยังคงเหนียวไม่ฉีกขาดและมีสีคล้ำขึ้นเนื่องจากแบคทีเรียสร้างสารต้านจุลินทรีย์หลายชนิดซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราอื่นๆได้หลายชนิด (Akhurst, 1983; Webster *et al*., 1998 อ้างถึงใน Shrestha and Kim, 2007)

การใช้แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ในการควบคุมแมลง

แบคทีเรีย *X. nematophilus* มีประสิทธิภาพในการก่อโรคในแมลงอาศัยได้ดี Goodrich-Blair and Clarke (2007) รายงานว่า หากนำแบคทีเรียเพียง 5 โคโลนีต่อยูนิตเข้าสู่ระบบ

เลือดของแมลง แบคทีเรียสามารถก่อให้เกิดความผิดปกติต่อระบบภูมิคุ้มกันของแมลง ซึ่งส่งผลให้ระบบเลือดเกิดการติดเชื้อและจะทำให้แมลงตายภายใน 48-72 ชั่วโมง นอกจากตัวเซลล์ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* จะมีพิษต่อแมลงแล้ว หากนำอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียมากรองผ่านเยื่อกระดาษชนิดพิเศษที่มีรูขนาดเล็กเพื่อกั้นไม่ให้เซลล์แบคทีเรียลอดผ่านได้ (nitrocellulose membrane) ขนาด 0.45 ไมครอน จะได้ส่วนใสหรือน้ำกรองของแบคทีเรีย (supernatant) และเมื่อนำส่วนใสดังกล่าวมาทดสอบความเป็นพิษกับแมลงพบว่าส่วนใสที่ได้สามารถทำให้แมลงตายได้เช่นกัน (ประภัสสร, 2554)

นักวิจัยในหลายประเทศได้ทดลองเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว และนำสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรีย (bacterial suspension) รวมทั้งส่วนใสหลังการกรองแบคทีเรียออกแล้ว มาทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า แบคทีเรียสามารถสร้างความผิดปกติหรือฆ่าแมลงได้หลายชนิด เช่น จากการทดลองของ Abdel-Razek (2003) พบว่าการพ่นสารแขวนลอยของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^3, 5×10^3, 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 4×10^5 และ 5.5×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ลงบนใบกะหล่ำซึ่งมีดักแด้ของหนอนใยผัก *Plutella xylostella* (L.) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22-23 องศาเซลเซียส พบว่าสารแขวนลอยของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่ระดับความเข้มข้น 5.5×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร สามารถฆ่าดักแด้หนอนใยผักได้ 40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้แบคทีเรียยังส่งผลต่อตัวเต็มวัยของหนอนใยผักซึ่งได้รับพิษของแบคทีเรียเกิดความผิดปกติ โดยทำให้จำนวนไข่และอัตราการฟักของหนอนวัยแรกลดลงด้วย

Mahar *et al*. (2004) พบว่า การใช้สารแขวนลอยและส่วนใสที่ผ่านการกรองแล้วของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ฉีดพ่นลงบนใบผักคะน้าซึ่งมีดักแด้ของหนอนใยผัก พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียสามารถเข้าสู่ภายในลำตัวของหนอนใยผักได้โดยไม่ต้องอาศัยไส้เดือนฝอยเป็นพาหะ นอกจากนั้นส่วนใสของแบคทีเรียซึ่งประกอบด้วยสารเมทาโบไลท์ต่างๆ ที่เซลล์ของแบคทีเรียผลิตขึ้น สามารถฆ่าดักแด้ของหนอนใยผักได้เช่นกัน

Mahar *et al.* (2005) พบว่า ส่วนใสของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่ระดับความเข้มข้น 4×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร สามารถฆ่าหนอนกินไขผึ้งได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 4 วัน ขณะที่สารแขวนลอยของแบคทีเรียสามารถฆ่าหนอนกินไขผึ้งได้ถึง 93 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 6 วัน

ศิริพรรณ และคณะ (2009) ทดสอบความสามารถในการทำลายไรไข่ปลาของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. nematophilus* โดยการฉีดพ่นพบว่าแบคทีเรียสามารถฆ่าไรไข่ปลาในระยะตัวเต็มวัยได้ 85 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 3 วัน ทดสอบความสามารถของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร สามารถฆ่าไรไข่ปลาระยะตัวเต็มวัยได้ 75.00 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 2 วัน และการทดสอบความสามารถในการทำลายไรไข่ปลาของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุแตกต่างกัน พบว่า แบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุ 2 วัน สามารถฆ่าไรไข่ปลาได้สูงถึง 88.34 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 4-5 วัน Namsena *et al.* (2016) ทดสอบสูตรสำเร็จของ *X. stokiae* พบว่าสูตรผงเปียกน้ำ (wettable powder, WP) สูตร liquid cell pellet (LC) และสูตร liquid supernatant (LS) มีประสิทธิภาพสูงสามารถฆ่าไรได้ 90.25, 86.50 และ 92.78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บสูตรสำเร็จที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) และ 4 องศาเซลเซียส เก็บไว้นาน 60 วัน พบว่าสูตรสำเร็จที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีคุณสมบัติในการฆ่าไรได้ 5-10 เปอร์เซ็นต์ และ 2-15 เท่าที่อุณหภูมิห้อง

นอกจากแบคทีเรียอาศัยร่วมในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะสามารถทำลายแมลงและไรดังกล่าวโดยไม่ต้องอาศัยไส้เดือนฝอยเป็นตัวพาเข้าสู่ลำตัวแมลงแล้ว ยังมีการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเหล่านี้สามารถทำลายแมลงได้อีกหลายชนิด เช่น *Schistocerca gregaria* (Forskal) (Mahar *et al.*, 2004) *Tribolium castaneum* (Herbst) (Shrestha and Kim, 2010) *Spodoptera exigua* (Hü bner), *Otiorhynchus sulcatus* Germar (Mahar *et al.*, 2008) และ *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Campos-Herrera *et al.,* 2009) เป็นต้น

แมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* มีชื่อสามัญภาษาอังกฤษ คือ Oriental fruit fly เป็นแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง แมลงวันผลไม้ชนิดนี้พบครั้งแรกที่หมู่เกาะ Saibai, Boigu และ Duuan ของทวีปออสเตรเลีย แพร่กระจายในปาปัวนิวกีนีเมื่อปี ค.ศ. 1993 ต่อมาพบแพร่กระจายทางตอนใต้ของสิงคโปร์ อินโดนีเซีย และบอร์เนียว (Drew, 2001) ทวีศักดิ์ (2541) และมนตรี (2544) รายงานว่าพบแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระบาดมากทางตอนใต้ของประเทศไทยและ

ประเทศมาเลเซีย สำหรับพืชอาศัยพบว่า มีมากกว่า 50 ชนิด เช่น มะเฟือง มะม่วงหิมพานต์ มะละกอ พริก มะเขือเทศ มะม่วง ส้มโอ และฝรั่ง เป็นต้น

สำหรับการจัดจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้ 4 ชนิด ได้แก่ *B. papayae* (Drew &Hancock), *B. philippinensis* (Drew & Hancock), *B. invadens* (Drew, Tsuruta & White) และ *B. carambolae* (Drew & Hancock) เป็นแมลงวันผลไม้ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาและพันธุกรรมใกล้เคียงกับแมลงวันผลไม้ ชนิด *B. dorsalis* (Hendel) มากที่สุด ส่วนแมลงวันผลไม้ชนิด *B. carambolae* มีลักษณะบางประการที่แตกต่างจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ จากการรวบรวมข้อมูลของแมลงวันผลไม้ทั้ง 3 ชนิดข้างต้น ทั้งข้อมูลทางสัญฐานวิทยาและชีวโมเลกุลได้ข้อสรุปว่า แมลงวันผลไม้ ชนิด *B. papayae*, *B. philippinensis* และ *B. invadens* เป็นสายพันธุ์เดียวกันภายใต้แมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* (Mark *et al*., 2015 อ้างถึงใน ฤทธิพร, 2559) ดังนั้นแมลงวันผลไม้ชนิด *B. papayae* ที่มีรายงานการระบาดในพื้นที่ทางภาคใต้ของประเทศไทย จึงต้องเปลี่ยนเป็น *B. dorsalis*

อนุกรมวิธาน (Integrated Taxonomic International System, 2013)

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Mandibulata
Class	Insecta
Oder	Diptera
Suborder	Brachycera
Family	Tephritidae

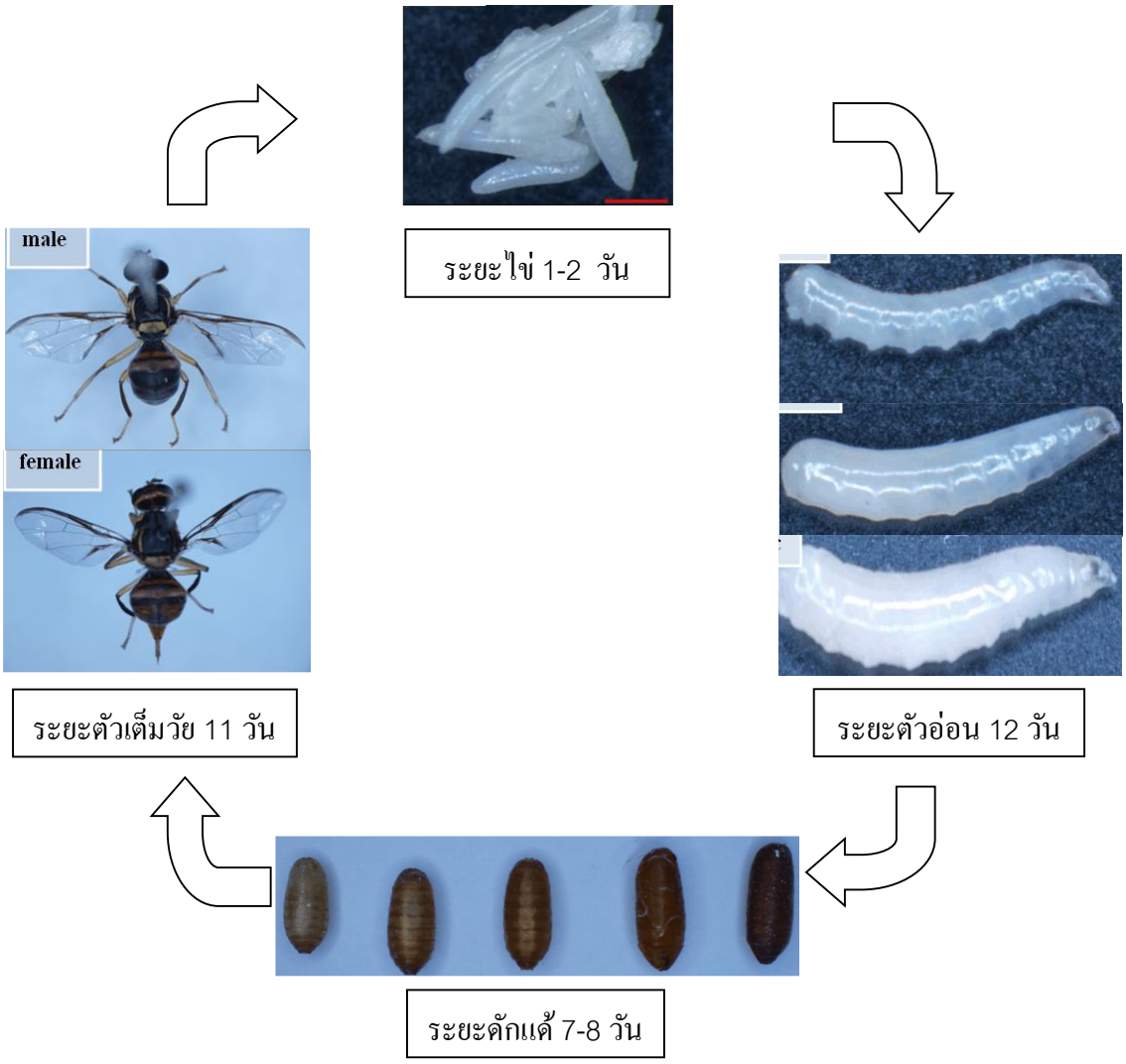
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* มีขนาดลำตัวยาวประมาณ 4.80 – 6.50 มิลลิเมตร ปีกยาวประมาณ 5.70 – 6.50 มิลลิเมตร หัวสีเหลือง ส่วน frons มีสีเหลืองอมน้ำตาล ใต้หนวดมีจุดรูปไข่ขนาดใหญ่ 2 จุด มีขน inferior fronto-orbital 2 คู่ และขน superior fronto-orbital 1 คู่ หนวดปล้องที่ 1 สีเหลืองหนวดปล้องที่ 2 และ3 มีสีน้ำตาล ส่วนปลาย arista สีน้ำตาลดำ บริเวณอก ส่วนของ

scutum มีสีดำ มีแถบสีเหลืองตรงส่วนของ mesonotum ทั้งสองข้าง และ scutellum มีสีเหลือง ส่วนของ fermur และ tibia สีน้ำตาล ปีกใส ท้องปล้องแรกสีน้ำตาล ปล้องที่ 2 ทางด้านข้างมีสีน้ำตาลเข้ม ปล้องที่ 3 มีสีดำคาดตามขวาง และตรงกลางมีแถบคาดสีดำ (ยุวรินทร์ และคณะ, ม.ป.ป.)

วัฏจักรชีวิต

แมลงวันผลไม้มีการเจริญเติบโตแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ ไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย (ภาพที่ 3) ไข่มีลักษณะโปร่งแสงมีสีขาวขุ่นรูปร่างคล้ายเมล็ดข้าว มีขนาดกว้างประมาณ 0.20 มม. ยาวประมาณ 0.40 มิลลิเมตร หลังจากตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้วางไข่ในพืชอาหารบริเวณใต้ผิวของพืชอาหารภายใน 1-2 วัน ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อน ตัวอ่อนมี 3 ระยะ ซึ่งใช้เวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 12 วัน เมื่อตัวอ่อนเจริญถึงวัยที่ 3 จะมีขนาดลำตัวยาวประมาณ 7.77 มิลลิเมตร กว้างประมาณ 1.84 มิลลิเมตร จะลอกคราบเป็นดักแด้ ดักแด้มีรูปร่างคล้ายถังเบียร์ (barrel-shape) อาศัยอยู่ในดินลึกประมาณ 2-5 เซนติเมตร ในระยะแรกดักแด้มีสีซีดจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมน้ำตาลและสีจะเข้มขึ้นเรื่อยๆ จนกลายเป็นสีน้ำตาลแก่เมื่อใกล้ฟักเป็นตัวเต็มวัย ในระยะดักแด้ใช้เวลาประมาณ 7-8 วัน จึงจะฟักเป็นตัวเต็มวัย ประมาณ 11 วันจึงเริ่มวางไข่ในเนื้อเยื่อพืชอาศัย อายุขัยของตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 1-3 เดือน แมลงวันผลไม้มีอัตราการขยายพันธุ์ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับแมลงอื่นๆ บางชนิด สามารถวางไข่ได้เป็นระยะยาวนานเกือบตลอดอายุขัย โดยสามารถวางไข่ได้ทุกวัน เฉลี่ยวันละประมาณ 50 ฟอง ตลอดอายุจะวางไข่ได้มากถึง 3,000 ฟอง (สัญญาณี, ม.ป.ป.; Mohd Noor *et al.,* 2011)



ภาพที่ 3 วัฏจักรชีวิตของแมลงวันผลไม้ Bactrocera dorsalis (Hendel)

ที่มา : Mohd Noor *et al*. (2011)

การป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้

แมลงวันผลไม้เป็นศัตรูพืชที่สำคัญของไม้ผลและผักหลายชนิด ส่งผลให้การปลูกไม้ผลและผักในประเทศไทยนั้น มีปัญหาจากการทำลายของแมลงวันผลไม้ ทำให้ผลผลิตเสียหายและคุณภาพต่ำ ทำให้เกษตรกรต้องทำการป้องกันกำจัดซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิต ในการป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้ เกษตรกรนิยมใช้สารฆ่าแมลงพ่นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มติดผลจนถึงเก็บเกี่ยว ทำให้เกิดปัญหาของสารพิษตกค้างในผลผลิตและสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหาด้านกักกันพืชและถูกใช้เป็นเครื่องมือกีดกันทางการค้าจากต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น

สหรัฐอเมริกา กลุ่มสหภาพยุโรป ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ เกาหลีใต้ ไต้หวัน จีน และซาอุดิอาระเบีย (สัญญาณี และคณะ, ม.ป.ป.; กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556) เป็นสาเหตุให้แมลงวันผลไม้เป็นปัญหาในระดับประเทศที่ต้องให้ความสำคัญ ปัจจุบันการป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้มีอยู่หลายวิธี เช่น การควบคุมโดยชีววิธี การใช้สารเคมี การฉายรังสีเพื่อให้แมลงเป็นหมัน การใช้สารล่อ และการใช้เหยื่อโปรตีนควบคุมแมลงวันผลไม้ เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีมีลักษณะการดำเนินการและหลักการแตกต่างกัน Hendrichs (1996) กล่าวว่า การจัดการประชากรแมลงวันผลไม้อาจใช้วิธีใดวิธีหนึ่งหรือใช้หลายวิธีร่วมกัน เช่น การรักษาความสะอาดของแปลงปลูก การติดตามประชากร การเก็บผลผลิตก่อนที่จะสุก การห่อผล การปล่อยศัตรูธรรมชาติ และการทำลายพืชอาศัยอื่นๆ ทั้งนี้ต้องได้รับความร่วมมือจากกลุ่มเกษตรทั้งในพื้นที่เพาะปลูกและบริเวณใกล้เคียง และยังแนะนำให้มีการปล่อยแมลงวันที่เป็นหมัน การใช้เหยื่อโปรตีนทั้งในบริเวณที่มีการตั้งตัวของแมลงวันผลไม้ประจำถิ่น บริเวณที่มีการระบาดของแมลงวันผลไม้จากต่างถิ่น หรือบริเวณที่ปราศจากแมลงวันผลไม้เพื่อป้องกันการอพยพเข้ามาใหม่

การใช้เหยื่อโปรตีนควบคุมแมลงวันผลไม้

เนื่องจากแมลงวันผลไม้ต้องการอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลและโปรตีนเพื่อพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์และวางไข่ ตลอดจนใช้ในการดำรงชีพและขยายพันธุ์ โดยเฉพาะแมลงวันผลไม้เพศเมียต้องได้รับโปรตีนก่อนที่ไข่จะเจริญเต็มที่ ในบางกรณีก็ได้รับโปรตีนจากแบคทีเรียที่อยู่ตามใบพืช (White and Elson-harris, 1992) ดังนั้นแมลงวันผลไม้ทั้งเพศผู้และเพศเมียจึงถูกดึงดูดโดยเหยื่อโปรตีน (protein bait) ที่มีส่วนผสมของน้ำตาล โปรตีน และสารฆ่าแมลง แมลงวันผลไม้จะตายก่อนที่จะพร้อมผสมพันธุ์และวางไข่ โดยเหยื่อโปรตีนสามารถดึงดูดแมลงวันผลไม้ได้ในระยะทางสั้นๆ (10-20 ฟุต) ความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ของเหยื่อโปรตีนขึ้นอยู่กับสารฆ่าแมลงที่ใช้ (UH-CTAHR, n.d.)

การใช้เหยื่อโปรตีนแบบพ่น (protein bait sprays) ซึ่งประกอบด้วยสารดึงดูดและสารพิษมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1889 โดยเหยื่อหรือสารดึงดูดที่ใช้ในขณะนั้น คือ กากน้ำตาล (molasses) หรือสารละลายของน้ำตาล และสารพิษที่ใช้มักเป็นสารที่ออกฤทธิ์โดยการกิน (stomach poison) เช่น สารหนูตะกั่ว (lead arsenate) หรือ ปารีสกรีน (paris green) ต่อมาในปี ค.ศ. 1950 ในฮาวายมีการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซท (protein hydrolysate) เป็นสารดึงดูด จนกระทั่งช่วงกลางปี ค.ศ. 1980

จึงมีการเปลี่ยนจาก โปรตีนไฮโดรไลเซท ไปเป็นยีสต์ไฮโดรไลเซท (yeast hydrolysate) ทั้งนี้เพราะโปรตีนไฮโดรไลเซทนั้นผลิตโดยการไฮโดรไลซ์โปรตีนพืชด้วยกรดไฮโดรคลอริก ทำให้ได้เหยื่อโปรตีนที่มีค่าความเป็นกรด ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นนั้นไปทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้เกลือตกค้างอยู่ในเหยื่อ เมื่อพ่นเหยื่อโปรตีนไฮโดรไลเซทจึงมักทำให้เกิดอาการไหม้ปรากฏบนผลและใบพืช (Anonymous, 2002)

Meksongsee *et al*. (1988) สรุปในรายงานว่าเหยื่อโปรตีนเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการควบคุมแมลงวันผลไม้ในประเทศไทย มนตรี (2533, อ้างโดย สัญญาณี และคณะ มปป.) กล่าวว่า ในการป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้แม้มีหลายวิธี แต่วิธีการที่ได้ผลดีที่สุดคือการใช้เหยื่อโปรตีนพิษ

กรมส่งเสริมการเกษตรแนะนำการกำจัดแมลงวันผลไม้ในมะม่วงด้วยเหยื่อโปรตีนโดยการใช้ยีสต์โปรตีนออโตไลเซท 800 ซีซี ผสมสารฆ่าแมลงมาลาไธออน 83 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 280 ซีซี ผสมน้ำ 20 ลิตร พ่นเป็นจุดๆ กล่าวว่าวิธีนี้จะช่วยลดการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ได้อย่างดี (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2555)

สัญญาณี และคณะ, (ม.ป.ป.) พบว่า เหยื่อโปรตีนที่มีประสิทธิภาพดีในการดึงดูดแมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* คือ เหยื่อโปรตีนที่ใช้ Brewer yeast 5 กรัม ผสมกากน้ำตาล 15 กรัม สามารถดึงดูดแมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* ได้มากที่สุด โดยสามารถดึงดูดตัวเต็มวัยเพศเมียได้เฉลี่ย 5.33 ตัว ในขณะที่ดึงดูดตัวเต็มวัยเพศผู้ได้เฉลี่ย 3 ตัว ซึ่งมากกว่าเหยื่อโปรตีนที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ที่สามารถดึงดูดแมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* ตัวเต็มวัยเพศเมียและตัวเต็มวัยเพศผู้ได้เฉลี่ย 0.50 และ 0.67 ตัวตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีการนำเหยื่อโปรตีนมาใช้ร่วมกับสารฆ่าแมลงในการควบคุมแมลงวันผลไม้โดยการใช้การใช้เหยื่อพิษโปรตีนอินไวท์เพื่อป้องกันกำจัดแมลงวันในระดับสวน พบว่า การพ่นด้วยเหยื่อพิษโปรตีน โดยผสมสารฆ่าแมลงมาลาไธออน 57 เปอร์เซ็นต์ EC อัตรา 10 มิลลิลิตร กับเหยื่อโปรตีนอินไวท์ อัตรา 200 มิลลิลิตร ในน้ำ 5 ลิตร พ่นเหยื่อโปรตีนพิษเป็นแถบทุกสัปดาห์ เริ่มพ่นตั้งแต่ฝรั่งติดผลประมาณ 1 เดือนหลังดอกบาน สามารถช่วยลดการเข้าทำลายจากแมลงวันไม้ในฝรั่งได้ (วิภาดา และคณะ, ม.ป.ป.)

อย่างไรก็ตามการใช้เหยื่อโปรตีนมีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป ในด้านของข้อเสียคืออาจให้ผลในการควบคุมไม่เพียงพอหากมีการระบาดรุนแรง หรือแปลงที่ใช้เหยื่อเป็น

แปลงขนาดเล็กล้อมรอบด้วยแปลงขนาดใหญ่ที่ไม่ใช้เหยื่อโปรตีน นอกจากนี้ประสิทธิภาพของการควบคุมอาจลดน้อยลงจากต้นฤดูเมื่อแมลงวันผลไม้เพศเมียเริ่มโตเต็มที่และมีการสร้างไข่แล้วจะให้ความสนใจกับอาหารน้อยกว่าการหาพื้นที่เหมาะสมเพื่อการวางไข่ (Anonymous, 2002) และอาจต้องฉีดพ่นบ่อยๆในช่วงฤดูฝน (Meksongsee *et al.*, 1988) ส่วนข้อดีของการใช้เหยื่อโปรตีนคือมีอันตรายน้อยต่อแมลงที่มีประโยชน์ จึงเหมาะกับการใช้ในการจัดการแมลงวันผลไม้ การฉีดพ่นเหยื่อโปรตีนเป็นจุดๆ จึงเป็นการลดปริมาณสารฆ่าแมลงทำให้แมลงนอกเป้าหมายมีที่หลบซ่อนมากขึ้น ต้นทุนเนื่องจากการใช้สารฆ่าแมลงและแรงงานลดลง เหยื่อโปรตีนเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเพราะใช้สารฆ่าแมลงน้อยลง และเป็นอันตรายต่อเกษตรกรน้อยลง (Anonymous, 2002)

แมลงช้างปีกใส *Mallada basalis* (Walker)

แมลงช้างปีกใสเป็นแมลงตัวห้ำที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่สามารถกินศัตรูพืชได้หลายชนิด เช่น เพลี้ยอ่อน ไรแดง แมลงหวี่ขาว เพลี้ยหอย เพลี้ยแป้ง หนอนตัวเล็กๆ ของผีเสื้อและไข่ของแมลงหลายชนิดในธรรมชาติ (พิมลพร, 2545) และสามารถนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพื่อควบคุมศัตรูพืชได้ดี

อนุกรมวิธาน (Cheng *et al*, 2010)

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Mandibulata
Class	Insecta
Order	Neuroptera
Family	Chrysopidae

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวัฏจักรชีวิต

การเจริญเติบโตของแมลงช้างปีกใสมี 4 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ ระยะตัวอ่อน ระยะดักแด้และระยะตัวเต็มวัย ซึ่งแต่ละระยะจะมีลักษณะและระยะเวลาในการเจริญเติบโตแตกต่างกันออกไป (ภาพที่ 4)

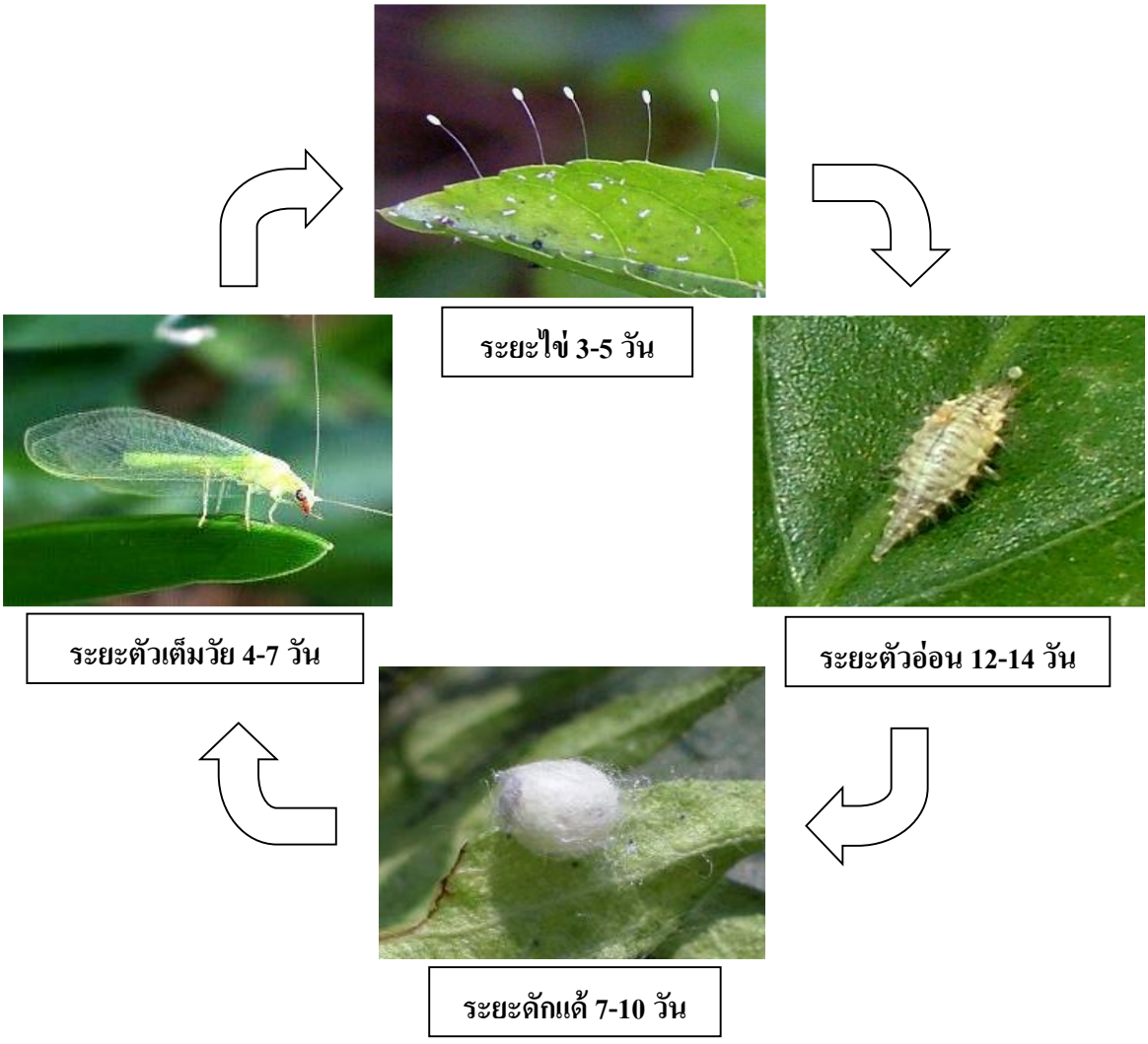
ณัฏฐิณี และคณะ (ม.ป.ป.) รายงานผลการศึกษาชีววิทยาของแมลงช้างปีกใส *M. basalis* (Walker) พบว่า ในระยะไข่ (egg stage) ไข่จะวางเป็นกลุ่มหรือฟองเดี่ยว ๆ มีก้านชูสีขาว

ใสคล้ายเส้นด้าย ความยาวเฉลี่ย 5.6 มิลลิเมตร ลักษณะไข่รูปร่างยาวรี มีสีเขียวอ่อนเมื่อวางใหม่ ๆ เมื่อใกล้ฟักจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล บริเวณด้านบนของไข่มีรู micropyle ไข่มีขนาดความกว้างไข่เฉลี่ย 0.34+0.01 มิลลิเมตร ความยาวเฉลี่ย 0.74+0.01 มิลลิเมตร ในระยะนี้จะใช้เวลา 3-5 วัน จึงจะฟักออกมาเป็นตัวอ่อน เมื่อฟักเป็นตัวอ่อน (larval stage) ตัวอ่อนของแมลงช้างปีกใส *M. basalis* เป็นแบบ campodeiform มีกรามโค้งยาวยื่นไปด้านหน้าเพื่อใช้ทำลายเหยื่อและดูดกินของเหลวภายในจนเหยื่อตาย เมื่อฟักเป็นวัย 1 จะเป็นตัวห้ำทันที เมื่อทำลายเหยื่อแล้วจะนำเศษซากของเหยื่อขึ้นไปไว้ด้านบนลำตัว ตัวอ่อนมี 3 วัย ในระยะนี้จะใช้เวลารวมทั้งสิ้น 12-14 วันจึงเริ่มเข้าดักแด้ ลักษณะรูปร่างตัวอ่อนแต่ละวัยมีดังนี้

- ตัวอ่อนวัยที่ 1 เมื่อฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ จะมีสีน้ำตาลอ่อน บริเวณด้านข้างของปล้องอกมีเส้นขนเล็กๆ หลายเส้น ทั้งปล้องอกและปล้องท้องบริเวณด้านบนมีเส้นขนสั้นๆ จำนวนมากไว้สำหรับเป็นที่ยึดเกาะของเศษซากอาหารและขยะ ด้านบนของลำตัวมีเศษซากอาหารและขยะเกาะอยู่ไม่มากนัก ความกว้างลำตัวโดยเฉลี่ย 0.32±0.04 มิลลิเมตร ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย 1.13±0.13 มิลลิเมตร
- ตัวอ่อนวัยที่ 2 ลำตัวมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น ส่วนอกและส่วนท้องมีขนาดใหญ่ขึ้น ด้านข้างของปล้องอกมีเส้นขนเล็ก ๆ หลายเส้น บริเวณอกปล้องที่ 1 มีจุดสีน้ำตาลอ่อนรูปวงรี 2 จุด และอกปล้องที่ 2 มีจุดสีน้ำตาลอ่อนขนาดเล็กว่าอกปล้องที่ 1 จำนวน 2 จุด บริเวณด้านบนของลำตัวมีเศษซากอาหารและขยะเกาะอยู่มากขึ้น ความกว้างลำตัวโดยเฉลี่ย 0.96±0.19 มิลลิเมตร ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย 3.54±0.66 มิลลิเมตร
- ตัวอ่อนวัยที่ 3 ลำตัวมีสีขาวขุ่น ขนาดลำตัวโตกว่าระยะอื่น ๆ ปล้องอกและปล้องท้องมีขนาดใหญ่ขึ้น จุดสีน้ำตาลอ่อนบริเวณอกปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 มีสีเข้มขึ้นจนเป็นสีดำ ความกว้างลำตัวโดยเฉลี่ย 1.09±0.10 มิลลิเมตร ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย 3.86±0.33 มิลลิเมตร

จากนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ (pupal stage) ดักแด้มีรูปร่างกลม ตัวอ่อนวัย 3 จะสร้างเส้นใยสีขาวปกคลุมลำตัวแล้วเข้าดักแด้อยู่ภายในและมีเศษขยะปกคลุมอยู่ด้านนอก โดยตัวอ่อนมักเข้าดักแด้ติดกับใบพืชหรือภาชนะที่เลี้ยง ความกว้างดักแด้โดยเฉลี่ย 2.69±0.06 มิลลิเมตร ความยาวดักแด้โดยเฉลี่ย 3.08±0.19 มิลลิเมตร ในระยะดักแด้จะใช้เวลา 7-10 วัน จึงจะลอกคราบเป็นตัวตัวเต็มวัย เมื่อเป็นตัวเต็มวัย (adult) ตาสีแดง หนวดเป็นแบบ filiform ปีกแบบ membrane สีเขียวอ่อนใส และมีเส้นปีกจำนวนมาก ขนาดเท่ากันทั้ง 4 ปีก เมื่อเกาะนิ่งจะหุบปีกเป็นรูปหลังคา ลำตัวมีสี

เขียวอ่อน โดยเพศผู้สีลำตัวจางกว่าเล็กน้อย มีปล้องท้องจำนวน 8 ปล้อง บริเวณส่วนท้องของเพศเมียมีรูปร่างกลมมน ปลายท้องแหลม ส่วนท้องของเพศผู้มีรูปร่างเพรียว ปลายท้องตัดตรง ขนาดลำตัวเพศเมียจะใหญ่กว่าเพศผู้ ความกว้างลำตัวเพศเมียโดยเฉลี่ย 1.07±0.25 มิลลิเมตร ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย 8.35±0.55 มิลลิเมตร ความกว้างลำตัวเพศผู้โดยเฉลี่ย 0.66±0.07 มิลลิเมตร ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย 7.07±1.01 มิลลิเมตร หลังจากจับคู่ผสมพันธุ์กันแล้ว 4-7 วัน เพศเมียจึงเริ่มวางไข่ ตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้ตั้งแต่ 418-552 ฟอง



ภาพที่ 4 วัฏจักรชีวิตของแมลงช้างปีกใส *Mallada basalis* (Walker)

ที่มา : ยุพิน (ม.ป.ป.)

ในประเทศไต้หวันมีรายงานการใช้ *M. basalis* ในการควบคุมศัตรูพืชในพืชหลายชนิด เช่นการนำไปใช้ควบคุมไรศัตรูพืช *Tetranychus kanzawai* และ *Tetranychus urticae* (Acarina

: Tetranychidac) บนต้นสตรอเบอรี่ ได้รับความสำเร็จเป็นอย่างมากพบว่าสามารถทำลาย *T. kanzawai* ได้ถึง 60-90% และ *T. urticae* ได้ถึง 50-90% (Chang and Huang, 1995)

พิมลพร (2545) รายงานว่าแมลงช้างปีกใส เป็นแมลงห้ำทั่วไปกินอาหารได้หลายชนิด เหยื่อที่ชอบมากที่สุด คือ เพลี้ยอ่อน แมลงช้าง 1 ตัวสามารถกินเพลี้ยอ่อนได้ 100-600 ตัว แมลงช้างปีกใสมีประโยชน์มากในการนำไปปล่อยในโรงเรือนที่ปลูกพืชและได้นำไปปล่อยควบคุมศัตรูพืชแล้ว เช่น ควบคุมเพลี้ยอ่อนบนกุหลาบ และในถั่วลันเตาสามารถลดการระบาดได้ดี ดังนั้นเพื่อการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี หรือภายใต้ระบบการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน การศึกษาถึงผลกระทบในการใช้แบคทีเรีย *X. Nematophilus* ต่อแมลงช้างปีกใส *M. basalis* จึงเป็นสิ่งสำคัญ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปริมาณและระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ในเหยื่อล่อโปรตีนต่อตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis*
2. เพื่อศึกษาผลกระทบของเหยื่อล่อโปรตีนที่มีแบคทีเรีย *X. nematophilus* ต่อแมลงช้างปีกใส *M. basalis*

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1. การแยกและจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*

1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*

แยกเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* จากไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ทำโดยใช้วิธีการของ วัชรี (2544) โดยนำกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จำนวน 1 แผ่นวางในจานเพาะเชื้อ นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง พักไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น หยดไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ระยะที่ 3 (infective juvenile) อัตราความหนาแน่น 500 ตัวต่อมิลลิลิตร ลงบนกระดาษกรองในจานเพาะเชื้อให้ทั่ว นำหนอนกระทู้ผัก *S. litula* วัย 5 จำนวน 10 ตัว ใส่ลงไปในจานเพาะเชื้อดังกล่าว ปิดฝาแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง หนอนกระทูผักจะตายภายในเวลา 48 ชั่วโมง นำซากหนอนกระทู้ผักที่ตายมาฆ่าเชื้อจุลินทรย์อื่นๆ บริเวณผิวรอบนอกของซากหนอนโดยแช่ซากหนอกระทู้ผักด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 0.1% ผสมกับ tween 80 จำนวน 1-2 หยด นาน 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำมาวางในจานเพาะเชื้อ จากนั้นใช้คีมคีบปลอดเชื้อคีบบริเวณขาเทียมของหนอนดึงให้ตึง ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดบริเวณขาเทียมและกดซากหนอนเบาๆ เพื่อให้เลือดในตัวหนอนไหลออกมา จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเลือดจากซากหนอนป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar containing bromothymol blue and triphenyltetrazolium chloride (NBTA) นำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA มาตรวจดูจะพบโคโลนีของแบคทีเรียมีสีน้ำเงิน เนื่องจากแบคทีเรีย *X. nematophilus* ระยะปฐมภูมิที่เจริญอยู่บนอาหาร NBTA สามารถดูดกลืนสี bromothymol blue ที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จากนั้น

แยกเชื้อแบคทีเรียที่มีโคโลนีลักษณะดังกล่าวลงบนอาหาร NBTA อีกครั้งเพื่อให้ได้โคโลนีของเชื้อที่บริสุทธิ์ ทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) เพื่อย้อมสีแกรมและจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียต่อไป

1.2 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus*

จำแนกชนิดของแบคทีเรียดำเนินการตามขั้นตอนจากหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol.2 (Sneath, 1986) โดยมีลำดับการทดสอบดังนี้

1.2.1 MacConkey agar (MCA) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็น selective medium หากแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบเป็นแบคทีเรียแกรมลบจะเกิดปฏิกิริยา lactose fermentation ทำให้โคโลนีของแบคทีเรียที่ได้มีสีชมพู

- **วิธีการทดสอบ** ทดสอบโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียมาป้ายลงบนอาหาร MCA โดยวิธีการ streak plate เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวๆ บ่มในตู้บ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง จึงนำมาตรวจผล
- **การแปลผล** ถ้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็น *X. nematophilus* ผลการทดสอบที่ได้คือเชื้อแบคทีเรียต้องสามารถเจริญบนอาหาร MCA ได้ และจะเกิดปฏิกิริยา lactose fermentation ทำให้โคโลนีของแบคทีเรียที่ได้มีสีชมพู

1.2.2 Blood agar (BA) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดของสัตว์เลือดอุ่นลงไป (เลือดคน 5%) ถ้าแบคทีเรียสามารถสามารถเจริญเติบโตบนอาหารและสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ (Hemolysis) จะเกิด clear zone ขึ้นรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรีย

- **วิธีการทดสอบ** ทดสอบโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแล้วมาป้ายลงบนอาหาร BA
- **การแปลผล** ถ้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็น *X. nematophilus* ผลการทดสอบที่ได้คือเชื้อแบคทีเรียต้องสามารถเจริญบนอาหาร BA และให้ผลการแตกตัวของเม็ดเลือดเป็นแบบ Beta hemolysis

Beta hemolysis หมายถึง เกิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ สังเกตเห็นบริเวณใส (clear zone) เกิดขึ้นรอบโคโลนีของแบคทีเรีย

Alpha hemolysis หมายถึง เกิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงแบบไม่สมบูรณ์ เกิดสีเขียวถึงสีน้ำตาลบริเวณรอบโคโลนีของแบคทีเรีย

Gamma hemolysis หมายถึง ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงบนอาหาร BA

1.2.3 Nutrient agar containing bromothymol blue and triphenyltetrazolium chloride (NBTA) เป็นอาหารที่สามารถแยก symbiotic bacteria ที่มีการดูดสีของ bromothymol blue (BTB)

- **วิธีการทดสอบ** ทดสอบโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียมาป้ายลงบนอาหาร NBTA โดยวิธีการ streak plate เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวๆ บ่มในตู้บ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง จึงนำมาตรวจผล
- **การแปลผล** ถ้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็น *X. nematophilus* ผลการทดสอบที่ได้คือเชื้อแบคทีเรียต้องสามารถเจริญบนอาหาร NBTA และโคโลนีของแบคทีเรียจะมีสีน้ำเงิน

1.2.4 Catalase test เป็นการทดสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ catalase ซึ่งเป็น hemeprotein ที่มีอยู่ในระบบ cytochrome ของแบคทีเรียที่เป็น aerobe หรือ facultative anaerobe

- **วิธีการทดสอบ** ใช้ปากกาแบบ permanent วาดรูปวงกลมลงบนด้านหลังของแผ่นกระจกสไลด์ 2 วง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร เพื่อทำเครื่องหมายเป็นบริเวณที่เราจะเขี่ยเชื้อลงไป จากนั้นหยด 3% H_2O_2 1 หยด ลงในช่องวงกลมที่วาดไว้ แล้วเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปในสารที่หยดไว้ อ่านผลทันที
- **การแปลผล** + : มีฟองอากาศเกิดขึ้น
  - : ไม่มีฟองอากาศ

ถ้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็น *X. nematophilus* จะให้ผลเป็นลบ คือ ไม่มีฟองอากาศ

1.2.5 Oxidase test แบคทีเรียที่เจริญได้ในที่ที่มีอากาศเท่านั้น (aerobic bacteria) จะมีกระบวนการ oxidative phosphorylation สำหรับกระบวนการหายใจและสร้างพลังงาน ระหว่างการเกิดกระบวนการนี้มีการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับออกซิเจนโดยผ่าน cycle ของการส่งอิเล็กตรอน ซึ่งอาศัยการทำงานของ Cytochrome C oxidase ของเชื้อแบคทีเรียซึ่งจะไป oxidize สารเคมีทำให้เกิดสารประกอบสีม่วง

- **วิธีการทดสอบ** ใช้เข็มเขี่ยเชื้อป้ายเชื้อลงบนกระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร หยด 0.5% Tetramethyl-p-phenylenediamine ลงบนบริเวณที่ป้ายเชื้อเอาไว้ จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงภายใน 10 วินาที
- **การแปลผล**

  + : กระดาษกรองบริเวณที่ป้ายเชื้อลงไปเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินภายใน 10 วินาที

  - : ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

  ถ้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็น *X. nematophilus* จะให้ผลเป็นลบ คือ ไม่มีการเปลี่ยนสี

1.2.6 Triple sugar iron agar (TSI) เป็น differential medium ซึ่งสามารถทดสอบความแตกต่างของแบคทีเรียในการหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วให้กรดหรือให้กรดและแก๊ส (CO_2H_2) และความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างแก๊ส H_2S อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ต้องเตรียมเป็นอาหารแข็ง วางให้ผิวหน้าอาหารลาดเอียงในหลอดทดลอง TSI ประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต 3 ชนิด คือ แลคโตส 1% ซูโครส 1% กลูโคส 0.1%

- **วิธีการทดสอบ** เพาะเชื้อโดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อป้ายเชื้อลงบนผิหน้าอาหาร และแทงลงไปในอาหารให้ลึกถึงก้นหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง
- **การแปลผล** สังเกตการเปลี่ยนแปลงบริเวณผิวหน้าอาหาร และบริเวณก้นหลอดทดลอง หากอาหารบริเวณก้นหลอดเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองแสดงว่าเกิดกรด (acid ; A) สีแดงแสดงว่าเป็นด่าง (alkaline ; K) สีดำแสดงว่ามี H_2S และการมีฟองอากาศเกิดขึ้นในเนื้ออาหารแสดงว่าเกิดแก๊ส (G) ถ้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็น *X. nematophilus* จะเกิดสีแดง (alkaline) เฉพาะบริเวณผิวหน้าอาหารเท่านั้น ส่วนบริเวณก้นหลอดทดลองจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง (No change ; NC)

1.2.7 Indole test เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนทริปโทแฟน (tryptophan) เป็นอินโดน (indole) ได้หรือไม่ ทริปโตแฟนเป็น amino acid ชนิดหนึ่งมีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อพวกเพปโทน (peptone) หรือคาเซอิน (casein) เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารชนิดนี้ให้เชื้อเจริญเติบโตไปประมาณ 24-48 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบการสร้างอินโดลโดยการใส่สารละลาย para-dimethyl aminobenzaldehyde (Kovacs' reagent) ลงไป เมื่อสารชนิดนี้ทำปฏิกิริยากับอินโดลจะทำให้เกิดสีแดง

- **วิธีทดสอบ** เพาะเชื้อลงใน 1% peptone broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นหยด Kovacs' reagent 5 หยด เขย่าหลอดทดลองเบาๆ 2-3 ครั้ง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- **การแปลผล** + : ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีแดง (rad ring)

  \- : ผิวหน้าอาหารมีสีเหลืองเหมือน Kovacs' reagent

  ถ้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็น *X. nematophilus* จะให้ผลเป็นลบคือผิวหน้าของอาหารมีสีเหลือง

1.2.8 Methyl red test (MR) เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างกรดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบได้มากหรือน้อย โดยการตรวจดูค่า pH ของอาหารที่เชื้อเจริญเติบโตอยู่ เชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดได้มากจะทำให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 4.2 ซึ่งจะเปลี่ยนสี indicator ของ methyl red เป็นสีแดง

- **วิธีทดสอบ** เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน MR/VP broth นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นหยด methyl red 5 หยด ลงไปใน MR/VP broth ที่เพาะเชื้อไว้ สังเกตการณ์เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อทันทีหลังจากหยด indicator
- **การแปลผล** + : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง
  - : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

  ถ้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็น *X. nematophilus* จะให้ผลเป็นลบคือ อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

1.2.9 Voges-Proskauer test (VP) เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างสาร acethyl methyl carbinol จากกลูโคสได้หรือไม่ ในสภาวะที่สารละลายนั้นเป็นด่างสารนี้จะถูก oxidized เป็น diacetyl ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ cretine เกิดเป็นสีแดง แบคทีเรียกลุ่ม Klebsiella และ Enterobacter จะให้ผลบวกในการทดสอบนี้

- **วิธีการทดสอบ** เพาะเชื้อแบคทีเรียลงใน MR/VP broth นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หยด 5% naphthol จำนวน 6 หยด ลงไป เขย่าให้เข้ากัน หยด 40% KOH จำนวน 2 หยด ลงไป เขย่าให้เข้ากันพักไว้ 10-15 นาที สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- **การแปลผล** + : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง
  - : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

  ถ้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็น *X. nematophilus* จะให้ผลเป็นลบคือ อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

1.2.10 Citrate เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการใช้ citrate เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการ metabolism

- **วิธีการทดสอบ** เพาะเชื้อลงบนอาหาร Simmon's citrate agar โดยป้ายเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีบริเวณผิวหน้าของอาหาร
- **การแปลผล** + : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วง
  - : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ถ้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็น *X. nematophilus* จะให้ผลเป็นลบ คืออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

1.2.11 Motility test เห็นการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย โดยการเพาะเชื้อแบคทีเรียลงใน semisolid medium เป็นอาหารที่มี agar ผสมอยู่เพียง 0.5% เท่านั้น ซึ่งอาหารชนิดนี้เป็นอาหารที่ใช้สำหรับทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียโดยเฉพาะ

- **วิธีการทดสอบ** เพาะเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียแล้วแทงลงไปในอาหารตรงๆให้มีความลึกประมาณ 2 เซนติเมตร นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- **การแปลผล** + : พบแบคทีเรียแพร่กระจายบริเวณรอบๆรอยแทง หรืออาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น
  - : พบแบคทีเรียเติบโตอยู่แค่บริเวณรอยแทงเท่านั้นและอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองยังคงใสอยู่

ถ้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็น *X. nematophilus* จะให้ผลเป็นบวก คือพบแบคทีเรียแพร่กระจายบริเวณรอบๆรอยแทง หรืออาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น

1.2.12 Lysine decarboxylase test (LD) เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียมี enzyme decarboxylase สำหรับนำ carboxyl group ออกจากโมเลกุลของ lysine หรือไม่

decarboxylase เป็นเอนไซม์ที่จะถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นในภาวะที่เป็น anaerobe และมีความเป็นกรดพอสมควร หน้าที่ของ decarboxylase จะช่วย catalyse ปฏิกิริยา decarboxylation ต่อกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อเอนไซม์นั้นๆ

- **วิธีการทดสอบ** เพาะเชื้อลงใน lysine decarboxylase test medium นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- **การแปลผล** + : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและมีสีม่วง
  - : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและมีสีเหลือง

  ถ้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็น *X. nematophilus* จะให้ผลเป็นลบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและมีสีเหลือง

1.2.13 Urease test เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์ urease ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการย่อยสลาย urea ให้กลายเป็น ammonia ได้หรือไม่ โดย ammonia ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ indicator ใน urea agar ทำให้เกิดการเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพูบานเย็น

- **วิธีการทดสอบ** เพาะเชื้อลงบนอาหาร urea agar นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-6 วัน สังเกตการณ์เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำมาอ่านผลทุกวัน
- **การแปลผล** + : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพูบานเย็น
  - : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

  ถ้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็น *X. nematophilus* จะให้ผลเป็นลบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

1.2.14 Carbohydrate fermentation test เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการหมักคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิด ได้แก่ กลูโคส แมนนิทอล และซูโครส ผสมกับ fermentation medium ประกอบด้วย phenol red borth base มีความเข้มข้น 1% เป็นตัวชี้วัดสำหรับบอกความเป็นกรด

- **วิธีการทดสอบ** เพาะเชื้อลงใน carbohydrate fermentation ที่มีส่วนผสมของน้ำตาลชนิดต่างๆ นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการณ์เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อและการเกิดแก๊สใน Durham tube
- **การแปลผล** + : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง รายงานผลเป็น acid (A) หากพบเกิดแก๊สด้วย รายงานผลเป็น acid and gas (AG)

  \- : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีชมพูแดง

  Delayed : หากอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีส้มควรนำไปบ่มเชื้อต่อ

ถ้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็น *X. nematophilus* จะให้ผลเป็นบวก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองและไม่พบแก๊ส

2. การเลี้ยงเพิ่มปริมาณและนับจำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus*

2.1 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย

2.1.1 เตรียมอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 20 นาที พักให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2.1.2 นำเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่ผ่านการจำแนกชนิดแล้วมาเพาะเชื้อลงในอาหาร TSB นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30±5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.1.3 นำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่ได้จากข้อ 2.1.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเพาะเชื้อลงในอาหารอาหาร TSB อีกครั้ง นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30±5 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 8 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่ได้ไปนับจำนวนโคโลนี และวัดค่าการดูดกลืนแสง ทำซ้ำทุกๆ 8 ชั่วโมง จนครบ 56 ชั่วโมง

2.2 การนับโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* โดยวิธี Dilution technique และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader

2.2.1 นำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่ได้จากข้อ 2.1.3 มาทำให้เจือจาง โดยเซลล์แขลนลอยเชื้อ 1 มิลลิลิตร เจือจางแบบ 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร ผสมจนเข้ากันจะได้ความเข้มข้นในอัตราส่วน 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000 และ 1:1,000,000

2.2.2 นำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่เจือจาง 3 ความเข้มข้นสุดท้าย (1:10,000 , 1:100,000 , 1:1,000,000) ไป spresd plate บนอาหาร NA โดยหยดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. nematophilus* ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงไปเกลี่ยด้วย spreader บนผิวหน้าอาหาร NA ความเข้มข้นละ 2 plates นำไปบ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีของเชื้อที่ปรากฏ

2.2.3 นำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. nematophilus* มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader (Biotek PowerWaveX) ใช้เซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* ในแต่ละช่วงเวลา (8, 16, 24, 32, 40, 48 และ 56 ชั่วโมง) ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร นำความขุ่นที่ได้ไปเขียนกราฟกับจำนวนโคโลนีที่ได้ทำการนับจำนวนบนอาหาร NA

3. ทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันในการฆ่าตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis*

เลี้ยงเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *X. nematophilus* ด้วยวิธีการตามข้อ 2.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Desige ; CRD) ทรีทเมนต์คือ cell solution และ cell free filtrate ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ทำการทดลองทรีทเมนต์ละ 4 ซ้ำ ทดสอบโดยใช้ cell solution และ cell free filtrate (ส่วนใสเตรียมโดยนำเซลล์แขวนลองมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน (Rahoo *et al*., 2011)) ที่มีอายุใน

การเพาะเลี้ยง 8, 16, 24, 32, 40, 48 และ 56 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (blank medium) ใช้ตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* อายุ 4 วัน (นับจากวันที่เริ่มฟักออกมาจากดักแด้) จำนวน 20 ตัว (เป็นเพศผู้ 10 ตัว เพศเมีย 10 ตัว) ก่อนการทดสอบให้แมลงวันผลไม้อดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ใช้ cell solution และ cell free filtrate ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยง 8, 16, 24, 32, 40, 48 และ 56 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หยดลงบนฟองน้ำเอนกประสงค์ 1 ชิ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร หนา 0.5 เซนติเมตร วางในจานแก้ว นำไปวางในกรงผ้ามุ้งขนาด 30×30×30 เซนติเมตร จากนั้นปล่อยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เข้าไปในกรงข้างต้น บันทึกการตายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ที่อุณหภูมิห้อง) ปรับอัตราการตายด้วย Abbott's formula วิเคราะห์ค่าวาเรียนท์ (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple's Range Test (DMRT)

4. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ cell solution และ cell free filtrate ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ต่อการฆ่าแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis*

นำ cell solution และ cell free filtrate ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง มาทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสม วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complately Randomized Desige, CRD) ทรีทเมนต์คือ cell solution และ cell free filtrate ที่ระดับความเข้มข้น 1,000, 5,000, 10,000, 25,000, 50,000, 75,000, 100,000, 250,000, 500,000 และ 1,000,000 ppm (ml/10^3L) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (blank medium) ที่ระดับความเข้มข้น 1,000, 5,000, 10,000, 25,000, 50,000, 75,000, 100,000, 250,000, 500,000 และ 1,000,000 ppm (ml/10^3L) ทำการทดลองทรีทเมนต์ละ 4 ซ้ำ ใช้ตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* อายุ 4 วัน (นับจากวันที่เริ่มฟักออกมาจากดักแด้) จำนวน 20 ตัว (เป็นเพศผู้ 10 ตัว เพศเมีย 10 ตัว) เพื่อให้แมลงวันผลไม้ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* ก่อนการทดสอบให้แมลงวันผลไม้อดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ใช้ cell solution และ cell-free filtrates ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง มาเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 1,000, 5,000, 10,000, 25,000, 50,000, 75,000, 100,000,

250,000, 500,000 และ 1,000,000 ppm (ml/10^3L) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร หยดลงบนฟองน้ำเอนกประสงค์ 1 ชิ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร หนา 0.5 เซนติเมตร วางในจานแก้ว นำไปวางในกรงผ้ามุ้งขนาด 30×30×30 เซนติเมตรจากนั้นปล่อยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เข้าไปในกรงข้างต้น บันทึกการตายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ที่อุณหภูมิห้อง) ปรับอัตราการตายด้วย Abbott's formula วิเคราะห์ค่าวาเรียนท์ (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple's Range Test (DMRT) นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{95} ของ cell solution และcell free filtrate ของเชื้อที่มีอายุในการเพาะเลี้ยงเหมาะสมที่สุด ด้วยวิธีโพรบิท (Probit analysis) โดยมีเงื่อนไขว่า ถ้าเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ในชุดควบคุมอยู่ในช่วง 5-10 เปอร์เซ็นต์ จะปรับอัตราการตายด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925 อ้างโดย Busvine, 1980) ก่อนแล้วจึงนำมาคำนวณค่า LC_{50} และ LC_{95} แต่ถ้าเปอร์เซ็นต์การตายของชุดควบคุมมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ จะยกเลิกผลการทดลองแล้วทำการทดสอบใหม่ (Busvine, 1980)

5. ศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของ yeast hydrolysate เมื่อผสมกับ cell solution ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* 30 มิลลิลิตร (9.02×10^8 เซลล์ : มิลลิลิตร) เพื่อใช้เป็นเหยื่อพิษในการควบคุมตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis*

จากการทดลองที่ 4 นำ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมงและความเข้มข้น 100,000 ppm (ml/10^3L) มาผสมกับ yeast hydrolysate วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Desige, CRD) ทรีทเมนต์คือ cell solution มีอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมงและความเข้มข้น 100,000 ppm (ml/10^3L) 30 มิลลิลิตร (9.02×10^8 เซลล์ : มิลลิลิตร) ผสมกับ yeast hydrolysate ในอัตรส่วน 0.5:30 (yeast hydrolysate 0.5 กรัม : cell solution 30 มิลลิลิตร), 1:30, 1.5:30, 2:30, 2.5:30, 3:30, 3.5:30 และ4:30 โดยแต่ละทรีทเมนต์เปรียบเทียบกับชุดควบคุม yeast hydrolysate ต่ออาหาร TSB ในอัตราส่วน 0.5:30 (yeast hydrolysate 0.5 กรัม : TSB 30 มิลลิลิตร) , 1:30, 1.5:30, 2:30, 2.5:30, 3:30, 3.5:30 และ4:30 ตามลำดับ ทำการทดลอง

ทรีทเมนต์ละ 4 ซ้ำ ใช้ตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* อายุ 4 วัน ซึ่งเป็นระยะที่แมลงต้องการโปรตีนในการเจริญเติบโตและพัฒนาระบบสืบพันธุ์ จำนวน 20 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ 10 ตัว เพศเมีย 10 ตัว เพื่อให้แมลงวันผลไม้ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* ก่อนการทดสอบให้แมลงวันผลไม้อดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ใช้ cell solution มีอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมงและความเข้มข้น 100,000 ppm (ml/10^3L) 30 มิลลิลิตร (9.02×10^8 เซลล์ : มิลลิลิตร) ผสมกับ yeast hydrolysate กับ cell solution อัตราส่วน 0.5:30 (yeast hydrolysate 0.5 กรัม : cell solution 30 มิลลิลิตร), 1:30, 1.5:30, 2:30, 2.5:30, 3:30, 3.5:30 และ4:30 คนให้ yeast hydrolysate ละลาย วางฟองน้ำเอนกประสงค์ 1 ชิ้น ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร ลงในจานแก้ว หยด yeast hydrolysate ที่ผสมกับ cell solution ไว้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงไป จากนั้นนำไปวางในกรงผ้ามุ้งขนาด 30×30×30 เซนติเมตร ปล่อยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เข้าไปในกรงข้างต้น (แต่ละซ้ำจะให้น้ำตาล 2 กรัม โดยวางในจานแก้วแยกกับยีสต์) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม yeast hydrolysate ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ในอัตราส่วน 0.5:30 (yeast hydrolysate 0.5 กรัม : cell solution 30 มิลลิลิตร), 1:30, 1.5:30, 2:30, 2.5:30, 3:30, 3.5:30 และ4:30 ตามลำดับ บันทึกการตายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ที่อุณหภูมิห้อง) เปรียบเทียบกันโดยการวิเคราะห์ค่าวาเรียนท์ (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple's Range Test (DMRT)

6. ศึกษาผลกระทบเหยื่อล่อโปรตีนที่มี cell solution ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ต่อตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใส *Mallada basalis*

นำ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* มีอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง และความเข้มข้น 100,000 ppm (ml/10^3L) 30 มิลลิลิตร (9.02×10^8 เซลล์ : มิลลิลิตร) ผสมกับ yeast hydrolysate อัตราส่วน 0.5:30 (yeast hydrolysate 0.5 กรัม : cell solution 30 มิลลิลิตร) มาทดสอบกับตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใส *M. basalis* วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Desige, CRD) ทรีทเมนต์คือ ปริมาณที่เหมาะสมในการฆ่าแมลงวันผลไม้ของ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* เมื่อผสมกับ yeast

hydrolysate ทำการทดลองทรีทเมนต์ละ 4 ซ้ำ โดยแต่ละทรีทเมนต์เปรียบเทียบกับชุดควบคุม yeast hydrolysate ต่ออาหาร TSB ในอัตราส่วนเดียวกัน ใช้ตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใส *M. basalis* จำนวน 20 ตัว (เพศผู้ 10 ตัว เพศเมีย 10 ตัว) และใช้ตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* อายุ 4 วัน ซึ่งเป็นระยะที่แมลงต้องการโปรตีนในการเจริญเติบโตและพัฒนาระบบสืบพันธุ์ จำนวน 20 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ 10 ตัว เพศเมีย 10 ตัว เพื่อให้ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* ก่อนการทดสอบให้แมลงช้างปีกใสอดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทดสอบโดยการใช้ อัตราส่วนของ cell solution และยีสต์ไฮโดรไลเซท ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมงและความเข้มข้น 100,000 ppm (ml/10^3L) 30 มิลลิลิตร (9.02×10^8 เซลล์ : มิลลิลิตร) ผสมกับ yeast hydrolysate อัตราส่วน 0.5:30 (yeast hydrolysate 0.5 กรัม : cell solution 30 มิลลิลิตร) ในบีกเกอร์คนให้ yeast hydrolysate ละลาย วางฟองน้ำเอนกประสงค์ 1 ชิ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร ลงในจานแก้ว หยด yeast hydrolysate ผสมกับ cell solution ไว้ลงไปนำไปวางในกรงผ้ามุ้งขนาด 30×30×30 เซนติเมตร ปล่อยแมลงช้างปีกใส *M. basalis* และแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เข้าไปในกรงข้างต้น (แต่ละซ้ำจะให้น้ำตาล 2 กรัม โดยวางในจานแก้วแยกกับยีสต์และวางยีสต์ผสมน้ำผึ้ง) บันทึกการตายของแมลงช้างปีกใส *M. basalis* ทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ที่อุณหภูมิห้อง) วิเคราะห์ค่าวาเรียนท์ (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple's Range Test (DMRT)

7. ทดสอบระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ต่อตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis*

จากมีอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมงและความเข้มข้น 100,000 ppm (ml/10^3L) 30 มิลลิลิตร (9.02×10^8 เซลล์ : มิลลิลิตร) ผสมกับ yeast hydrolysate อัตราส่วน 0.5:30 (yeast hydrolysate 0.5 กรัม : cell solution 30 มิลลิลิตร) นำมาทดสอบการมีชีวิตรอดของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ต่อตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Completely Block Desige, RCBD) ทรีทเมนต์คือระยะเวลาหลังการฉีดพ่น ได้แก่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม yeast

hydrolysate ต่อน้ำกลั่น ในอัตราส่วนเดียวกัน ทำการทดลองทรีทเมนต์ละ 4 ซ้ำ ใช้ตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* อายุ 11 วัน ซึ่งเป็นระยะที่แมลงพร้อมวางไข่จำนวน 100 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ 50 ตัว เพศเมีย 50 ตัว นำ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ในปริมาตรที่เหมาะสม (30 มิลลิลิตร + yeast hydrolysate 0.5 กรัม จากข้อ 5) บรรจุในกระบอกฉีดพ่นยาแบบอัดลมพ่นน้ำยา ขนาด 0.5 ลิตร (One hand pressure sprayer) ยี่ห้อ YAMANO พ่นลงบนผลฝรั่งใช้ฝรั่ง 4 ผลต่อซ้ำ (ในการทดลองจะเลือกใช้ฝรั่งพันธุ์กิมจู น้ำหนักประมาณ 250 กรัม/ผล) ฉีดให้ทั่วทั้งผล แขวนไว้ในกรงผ้ามุ้งนาน 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดแล้วปล่อยตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* อายุ 11 วัน ซึ่งเป็นระยะที่แมลงพร้อมวางไข่จำนวน 100 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ 50 ตัว เพศเมีย 50 ตัวในกรงผ้ามุ้งขนาด ดังกล่าว ซึ่งภายในกรงจะประกอบด้วยฝรั่ง 4 ผล ต้นฝรั่งจำลอง 1 ต้น (เพื่อเป็นที่เกาะพักเลียนแบบสภาพในแปลงปลูกจริง) น้ำตาลและน้ำ (เพื่อเป็นอาหารแก่แมลง) บันทึกการตายของแมลงวันผลไม้ ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมง เก็บผลฝรั่งในแต่ละทรีทเมนต์ใส่กล่องพลาสติกใสขนาด 16.5×23.5×9.5 เซนติเมตร มาบ่มในห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจดูความเสียหายที่เกิดจากการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้โดยดูจากจำนวนหนอนและตัวเต็มวัยที่เจริญเติบโตจากผลฝรั่งที่ใช้ในการทดสอบ

8. ทดสอบแยกเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* จากซากตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis*

นำซากตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ที่ตายจากการได้รับ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ซึ่งมีลักษณะสีคล้ำลงสังเกตได้ตรงบริเวณส่วนท้องและซากแมลงจะแห้งช้ากว่าซากแมลงวันที่ตายตามปกติ (ภาพที่ 20) มาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีของเชื้อที่ปรากฏ

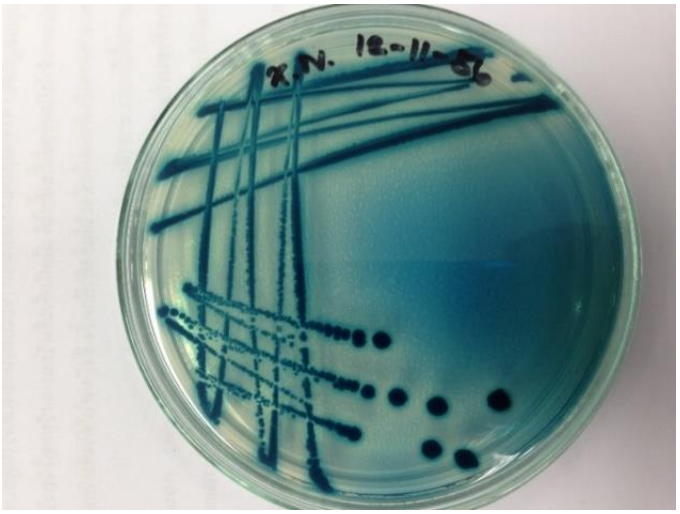
บทที่ 3

ผลและบทวิจารณ์

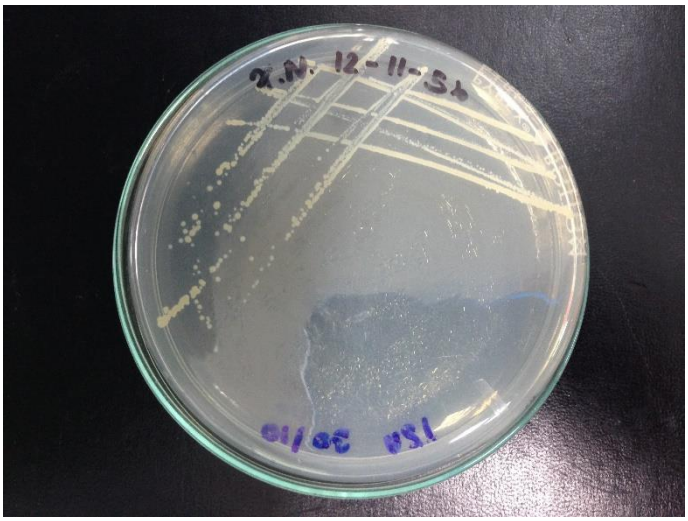
1. การแยกและจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*

1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus*

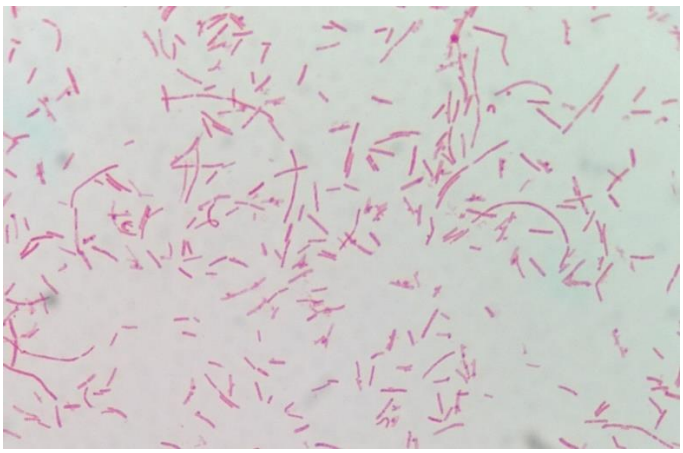
เมื่อหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* ที่ถูกไส้เดือนฝอย *Steinernematidae carpocapsae* ทำลายตายภายใน 48 ชั่วโมง ซากหนอนมีลักษณะไม่เน่า นำซากหนอนมาฆ่าเชื้อที่ผิวซากหนอนแล้วนำเลือดมาป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA พบว่าที่ 48 ชั่วโมง โคโลนีแบคทีเรียที่เกิดขึ้นมี 2 ลักษณะคือ โคโลนีที่มีสีแดง และโคโลนีที่มีสีน้ำเงินเข้ม โดยโคโลนีที่มีสีน้ำเงินเข้มเป็นโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถจากดูดสี bromthymol blue จากอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีลักษณะกลมนูน มี clear zone รอบๆ โคโลนี และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีน้ำเงินป้ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA อีกครั้งเพื่อให้ได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์ พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีลักษณะโคโลนีสีน้ำเงิน (ภาพที่ 5) และเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *X. nematophilus* บนอาหาร TSA พบว่าโคโลนีแบคทีเรียที่ได้มีสีขาวทึบแสง ลักษณะกลมนูน ผิวเรียบ มีขนาด 1-5 มิลลิเมตร (ภาพที่ 6) เมื่อย้อมสีแกรมแบคทีเรีย พบว่าติดสีแดงของ Safanin-o เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเซลล์เป็นแท่ง (rod shape) มีขนาดเซลล์กว้าง 0.8-1.4 ไมครอน ยาว 5.4-6.0 ไมครอน (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 5 โคโลนีแบคทีเรีย *X. nematophilus* มีสีน้ำเงินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA ที่ 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 6 โคโลนีแบคทีเรีย *X. nematophilus* มีสีเทาครีมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 7 ลักษณะเซลล์แบคทีเรีย *X. nematophilus* จากการย้อมแกรมเป็นแกรมลบ รูปแท่ง (กำลังขยาย 100X)

1.2 การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*

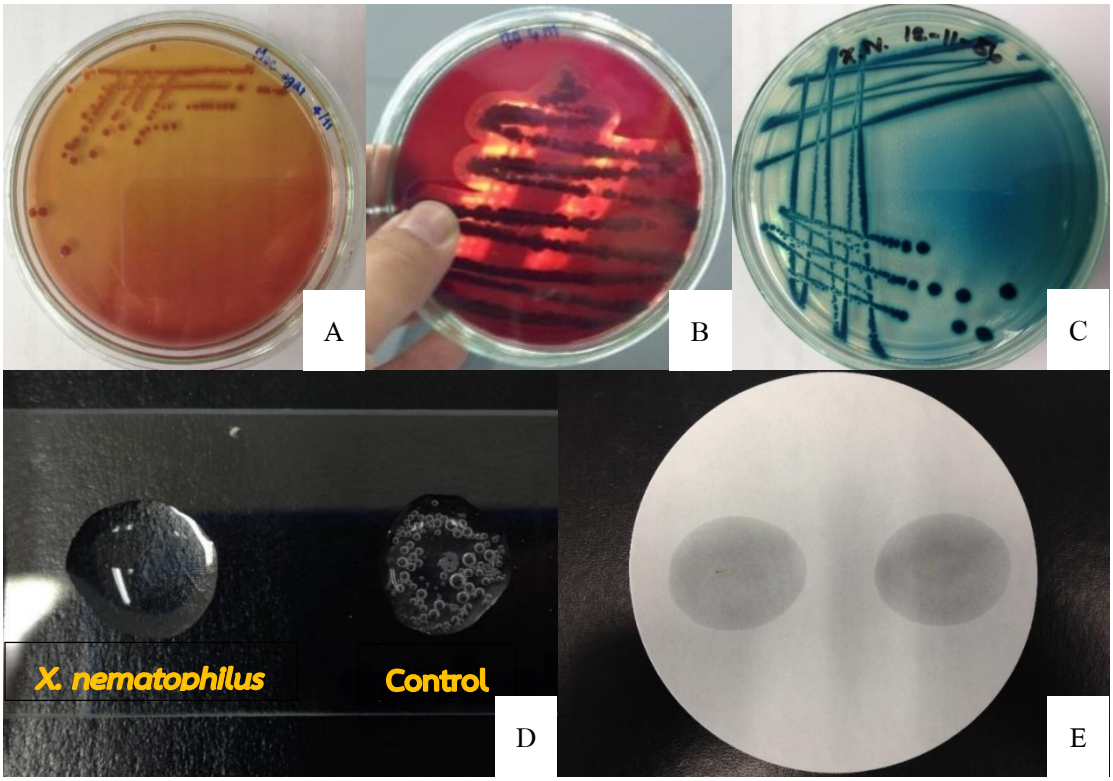
ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้

Characteristic	**คุณสมบัติ** *Xenorhabdus nematophilus*	**แบคทีเรียที่แยกได้** *Xenorhabdus nematophilus* **MM1**	**ผลการทดสอบ**
MCA	โคโลนีเป็นสีชมพู	โคโลนีเป็นสีชมพู	โคโลนีเป็นสีชมพู (ภาพที่ 8A)
Blood agar(BA)	Beta hemolysis	Beta hemolysis	Beta hemolysis (ภาพที่ 8B)
NBTA	โคโลนีเป็นเฉดสีน้ำเงินเข้ม	โคโลนีเป็นเฉดสีน้ำเงินเข้ม	โคโลนีเป็นเฉดสีน้ำเงินเข้ม (ภาพที่ 8C)
Catalase	-	-	- (ภาพที่ 8D)
Oxidase	-	-	- (ภาพที่ 8E)
TSI	Unknown	alkaline/No change	alkaline/A (ภาพที่ 8F)
Indole	-	-	- (ภาพที่ 8G)
MR	-	-	- (ภาพที่ 8H)
VP	-	-	- (ภาพที่ 8I)

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้ (ต่อ)

Characteristic	**คุณสมบัติ** *Xenorhabdus nematophilus*	**แบคทีเรียที่แยกได้** *Xenorhabdus nematophilus* **MM1**	**ผลการทดสอบ**
Citrate	-	-	- (ภาพที่ 8J)
LD	-	-	- (ภาพที่ 8K)
Motility	+	+	+ (ภาพที่ 8L)
Urea	-	-	- (ภาพที่ 8M)
Glucose	A/-	-	A (ภาพที่ 8N)
Sucrose	A	A	A (ภาพที่ 8O)
Mannitol	A	A	A (ภาพที่ 8P)

+ คือ ให้ผลบวก / - คือ ให้ผลลบ / A คือ acid



ภาพที่ 8 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้

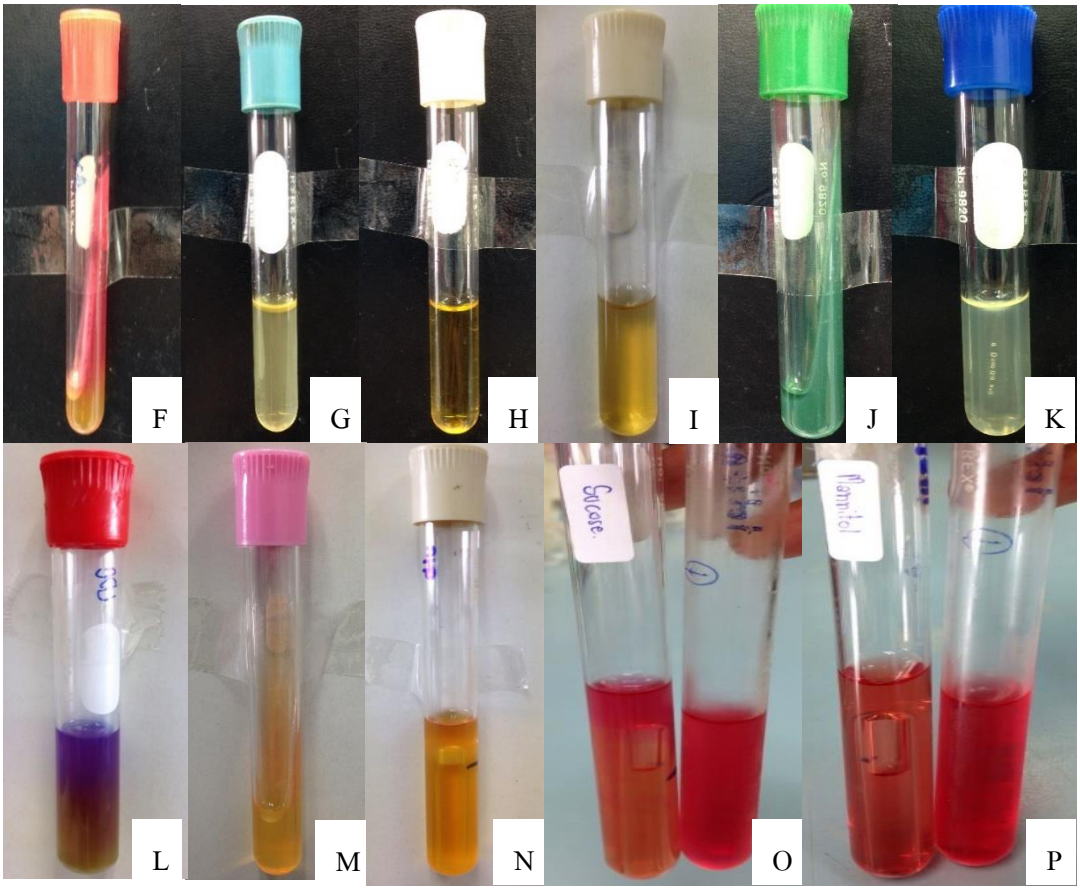
A ลักษณะโคโลนีสีชมพูของแบคทีเรีย *X. nematophilus* บนอาหาร MCA

B การทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกตัวอย่างรุนแรงของแบคทีเรีย *X. nematophilus* บนอาหาร Blood agar

C ลักษณะโคโลนีสีน้ำเงินเข้มของแบคทีเรีย *X. nematophilus* บนอาหาร NBTA

D การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Catalase ของแบคทีเรีย *X. nematophilus*

E การทดสอบ Oxidase test ของแบคที่เรีย *X. nematophilus*



ภาพที่ 8 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้ (ต่อ)

F ผลการทดสอบ TSI ของแบคที่เรีย *X. nematophilus* ให้ผล K/A

G ผลการทดสอบ Indole test ของแบคที่เรีย *X. nematophilus* ให้ผลลบ

H ผลการทดสอบ Methyl Red test ของแบคที่เรีย *X. nematophilus* ให้ผลลบ

I ผลการทดสอบ VP test ของแบคที่เรีย *X. Nematophilus* ให้ผลลบ

J ผลการทดสอบ Citrate test ของแบคที่เรีย *X. nematophilus* ให้ผลลบ

K ผลการทดสอบ Motility test ของแบคที่เรีย *X. nematophilus* ให้ผลบวก

L ผลจากการทดสอบ LD test ของแบคที่เรีย *X. nematophilus* ให้ผลลบ

M ผลการทดสอบ Urease test ของแบคที่เรีย *X. nematophilus* ให้ผลลบ

N ผลการทดสอบการหมัก glucose ของแบคที่เรีย *X. nematophilus*

O ผลการทดสอบการหมัก sucrose ของแบคที่เรีย *X. nematophilus*

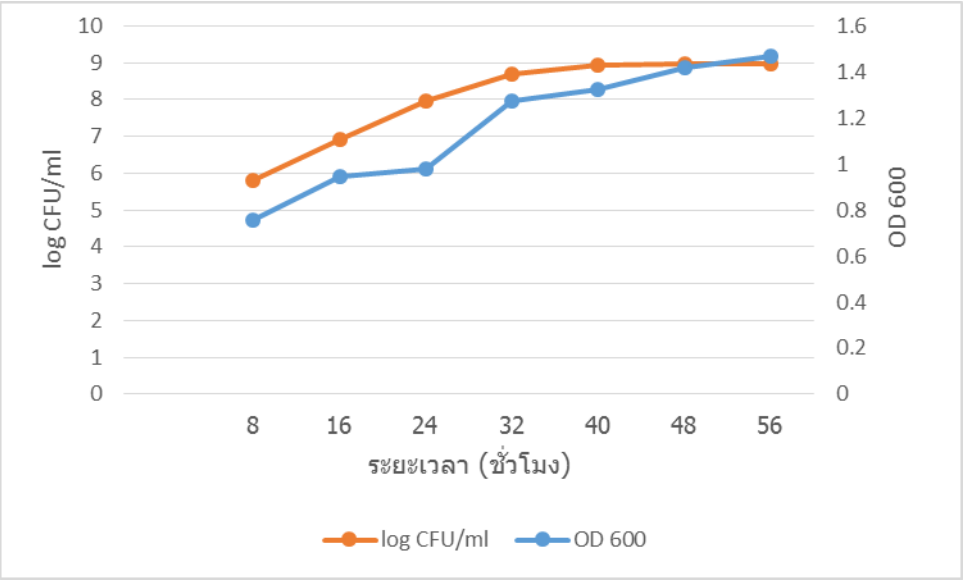
P ผลการทดสอบการหมัก mannitol ของแบคที่เรีย *X. nematophilus*

2. การเลี้ยงเพิ่มปริมาณและนับจำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhadus nematophilus* โดยวิธี Dilution technique และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader

เลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่ผ่านการจำแนกชนิดแล้วด้วยอาหารเหลว Trypticase Soy broth (TSB) โดยใช้ปริมาณ 100 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30±5 องศาเซลเซียส เมื่อครบทุกๆ 8 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนครบ 56 ชั่วโมง พบแบคทีเรียที่มีอายุในการเพาะเลี้ยงในช่วง 8-40 ชั่วโมง เป็นระยะที่แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและในช่วงอายุการเพาะเลี้ยง 40-56 ชั่วโมง อัตราการเจริญเติบโตเริ่มคงที่จำนวนแบคทีเรียสูงที่สุดและไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก ค่า doubling time (td) ของเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* เท่ากับ 5 ชั่วโมง 39 นาที และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.13 ต่อชั่วโมง เมื่อนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียพบว่าเซลล์แบคทีเรียที่มีอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 9.02×10^{8} CFU/ml (9.96 log CFU/ml) ซึ่งมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียเฉลี่ยสูงที่สุด โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.42 (วัดโดยใช้เครื่อง Microplate Reader ยี่ห้อ BIOTEK รุ่น PowerWaveX) (ตารางที่ 2 และรูปที่ 24) เนื่องจากมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียจำนวนมากเซลล์แบคทีเรียจึงดูดกลืนแสงได้มากจึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้น ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่ช่วงอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียสูงที่สุด

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและการตรวจนับโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhadus nematophilus* ในช่วงเวลาต่างๆ

ชั่วโมงที่	**ค่าการดูดกลืนแสง (600nm)**	**จำนวนเซลล์ (CFU/ml)**
8	0.75	6.35×10^{5}
16	0.95	8.30×10^{6}
24	0.98	9.40×10^{7}
32	1.28	5.02×10^{8}
40	1.32	8.89×10^{8}
48	1.42	9.02×10^{8}
56	1.47	8.99×10^{8}



ภาพที่ 9 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสง และจำนวน log เซลล์แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ในช่วงเวลาต่างๆ

3. ทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันในการฆ่าตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis*

ผลการศึกษาความสามารถของเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกันพบว่า cell solution ที่อายุการเพาะเลี้ยง 16 ชั่วโมง เป็นต้นไป และ cell free filtrate ที่อายุการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง เป็นต้นไปสามารถทำให้ตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ตายได้มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และ cell solution ของแบคทีเรียที่อายุการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง สามารถฆ่าแมลงได้สูงกว่าช่วงอายุการเพาะเลี้ยงอื่นๆ ขณะที่ cell free filtrate ของแบคทีเรียที่อายุการเพาะเลี้ยง 48 และ 56 ชั่วโมง สามารถฆ่าแมลงได้สูงกว่าช่วงอายุการเพาะเลี้ยงอื่นๆ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Abdel-Razek (2003), Mahar *et al.* (2004), ศิริพรรณ และคณะ (2009) แสดงผลดังตารางที่ 4

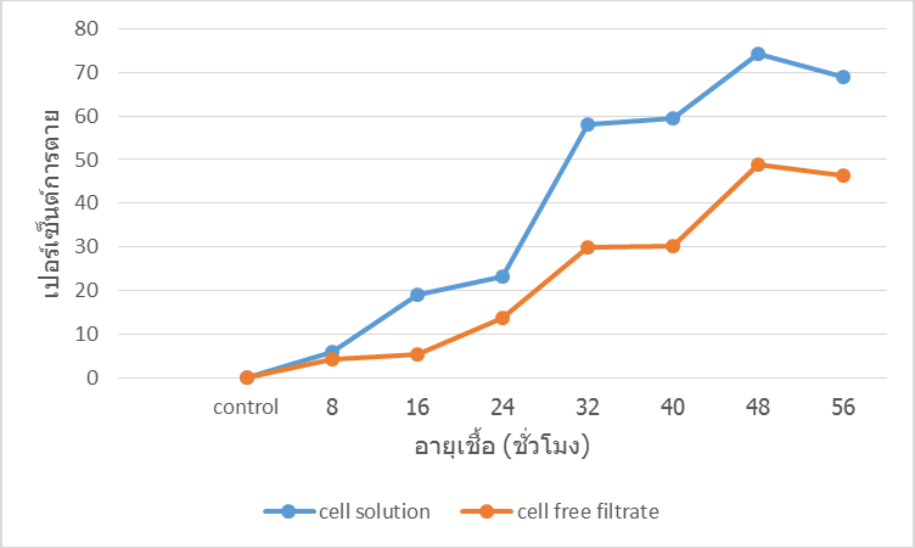
ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* ที่ตายจากการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกัน โดยวิธี cell solution และ cell free filtrates ของแบคทีเรีย

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	กรรมวิธี		T-test	C.V.(%))
	cell solution	cell free filtrate		
control	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	ns	0.00%
8	6.00±0.00 ab	4.25±2.66 a	ns	52.00%
16	19.00±6.25 ab	5.50±3.18 ab	ns	80.00%
24	23.25±6.13 b	13.75±3.30 b	ns	51.00%
32	58.00±4.34 c	30.00±4.64 c	*	21.00%
40	59.50±12.86 c	30.25±1.65 c	ns	33.00%
48	74.25±6.26 c	48.75±4.21 d	*	17.00%
56	69.00±4.22 c	46.50±1.55 d	*	10.00%
F-test	*	*		
C.V.(%)	79.00%	85.00%		

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's multiple range test

* หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 10 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* ที่ตายจากการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกัน โดยวิธี cell solution และ cell free filtrates ของแบคทีเรีย

เมื่อวิเคราะห์โดยการแยกเพศของแมลงวันผลไม้พบว่า การใช้ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 32 ชั่วโมง เป็นต้นไปทำให้แมลงวันผลไม้ *B. papayae* เพศผู้และเพศเมียตายสูงกว่าที่อายุการเพาะเลี้ยง 8, 16 และ 24 ชั่วโมง และการใช้ cell free filtrate ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 48 ชม. เป็นต้นไปทำให้แมลงวันผลไม้ทั้งเพศผู้และเพศเมียตายสูงกว่า cell free filtrate ที่มีอายุการเพาะเลี้ยง 8, 16, 24, 32 และ 40 ชั่วโมง แสดงผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การตายของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* เพศผู้และเพศเมียที่ตายจากการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกัน โดยวิธี cell solution และ cell free filtrates ของแบคทีเรีย

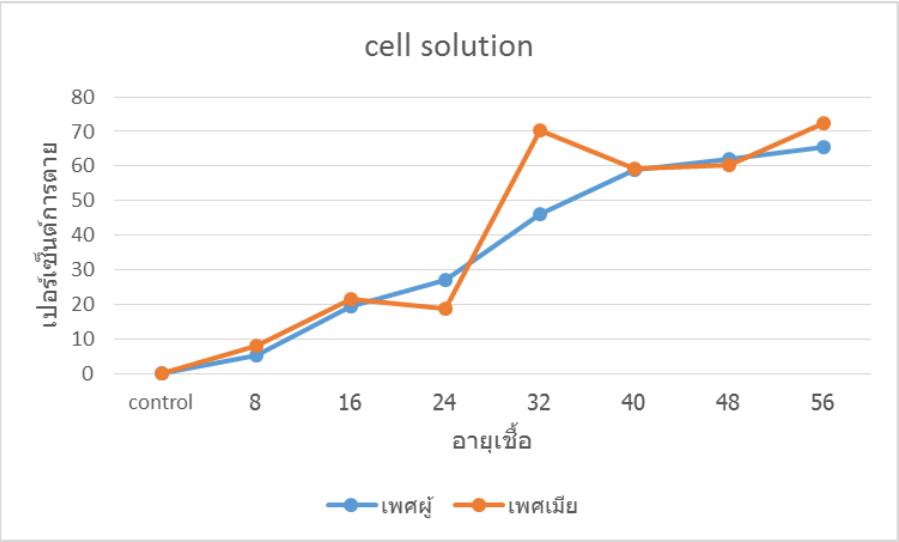
อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	เปอร์เซ็นต์การตาย ($\bar{x}$±SD)			
	cell solution		cell free filtrate	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
control	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a
8	5.50±3.20 ab	8.25±4.97 a	2.50±2.25 a	7.50±4.79 a
16	19.50±2.60 ab	21.75±7.60 a	3.00±3.00 a	7.50±4.79 a
24	27.00±9.26 bc	19.00±7.94 a	11.50±0.50 a	15.75±6.69 ab
32	46.25±7.88 cd	70.25±11.80 b	30.25±2.60 bc	29.50±6.91 b
40	59.00±15.31 d	59.25±11.08 b	27.25±6.18 b	32.00±4.64 b
48	62.00±7.49 d	60.25±19.02 b	46.25±7.88 d	50.25±9.40 c
56	65.50±8.97 d	72.25±5.77 b	40.75±4.03 cd	51.50±4.35 c
F-test	*	*	*	*
C.V.(%)	81.00%	86.00%	94.00%	88.00%

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's multiple range test

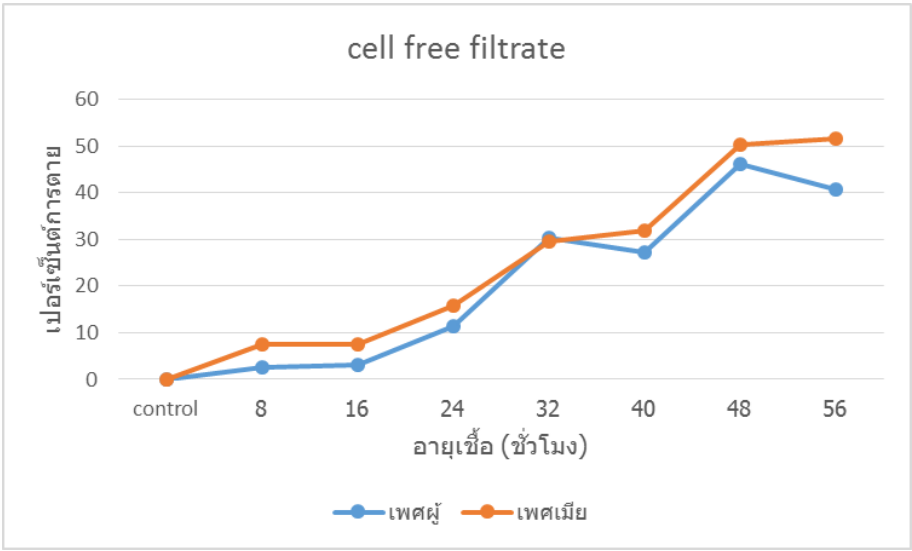
* หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* สามารถทำให้แมลงวันผลไม้ *B. papayae* ตายได้สูงสูงกว่า cell free filtrate อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อแบคทีเรียมีอายุการเพาะเลี้ยง 48 และ 56 ชั่วโมง แสดงผลดังตารางที่ 5 กว่า

เพศของแมลงวันไม่มีผลต่อความสามารถของแบคทีเรียของแบคทีเรีย *X. nematophilus* โดย cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ในแต่ละช่วงอายุการเพาะเลี้ยงทำให้จำนวนแมลงเพศผู้และเพศเมียตายไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกัน cell free filtrate ของเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีอายุการเพาะเลี้ยงของเชื้อแบคทีเรียทำให้จำนวนแมลงเพศผู้และเพศเมียตายไม่แตกต่างกัน แสดงผลดังตารางที่ 6 และตารางที่ 7



ภาพที่ 11 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การตายของแมลงวันผลไม้ *Bectrocera dorsalis* เพศผู้และเพศเมียที่ตายจากการได้รับ cell solution ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกัน



ภาพที่ 12 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การตายของแมลงวันผลไม้ *Bectrocera dorsalis* เพศผู้และเพศเมียที่ตายจากการได้รับ cell free filtrate ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกัน

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การตายของแมลงวันผลไม้ *Bectrocera dorsalis* เพศผู้และเพศเมียที่ตายจากการได้รับ cell solution ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกัน

กรรมวิธี / อายุเชื้อ (ชั่วโมง		เปอร์เซ็นต์การตาย ($\bar{X}$±SD)							
		control	**8**	**16**	**24**	**32**	**40**	**48**	**56**
cell solution	**เพศผู้**	0.00±0.00	5.50±3.20	19.50±2.60	27.00±9.26	46.25±7.88	59.00±15.31	62.00±7.49	65.50±8.97
	เพศเมีย	0.00±0.00	8.25±4.97	21.75±7.60	19.00±7.94	70.25±11.80	59.25±11.08	60.25±19.02	72.25±5.77
T-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.V.%		0.00%	119.00%	50.00%	75.00%	34.00%	45.00%	44.00%	22.00%

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี t- test แบบ dependent

* หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี t- test แบบ dependent

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การตายของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* เพศผู้และเพศเมียที่ตายจากการได้รับ Cell free filtrates ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่มีอายุเชื้อแตกต่างกัน

กรรมวิธี / อายุเชื้อ (ชั่วโมง)		เปอร์เซ็นต์การตาย ($\bar{X}$±SD)							
		control	**8**	**16**	**24**	**32**	**40**	**48**	**56**
cell free filtrate	**เพศผู้**	0.00±0.00	2.50±2.25	3.00±3.00	11.50±0.50	30.25±2.60	27.25±6.18	46.25±7.88	40.75±4.03
	เพศเมีย	0.00±0.00	7.50±4.79	7.50±4.79	15.75±6.69	29.50±6.91	32.00±4.64	50.25±9.40	51.50±4.35
T-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.V.%		0.00%	146.00%	149.00%	53.00%	32.57%	37.00%	36.00%	19.00%

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี t- test แบบ dependent

* หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี t- test แบบ dependent

จากการศึกษาพบว่า cell solution และ cell free filtrate ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* สามารถทำให้ตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ตายได้ โดยเมื่ออายุการเพาะเลี้ยงของเชื้อแบคทีเรียมากขึ้นจะมีความสามารถในการฆ่าแมลงมากขึ้น โดยเฉพาะที่อายุเชื้อ 48 ชม.ทั้ง cell solution และ cell free filtrate ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* มีความสามารถในการฆ่าแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้เท่ากับ 74.25±6.26 และ 48.75±4.21 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่า (8, 16, 24, 32 และ40 ชม.) อย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่อายุเชื้อ 56 ชั่วโมง จำนวนแมลงที่ตายเริ่มลดลง สอดคล้องกับการศึกษาเบื้องต้นซึ่งพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *X. nematophilus* จากช่วงอายุ 32, 40 ชั่วโมง มีอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกันจนถึงช่วงอายุ 48 ชั่วโมง เป็นช่วงที่แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดทำให้เป็นช่วงที่มีจำนวนแบคทีเรียสูงที่สุดและจะคงที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก (stationary phase) และช่วงอายุหลังจาก 48 ชั่วโมง เป็นต้นไปปริมาณแบคทีเรียก็จะลดลงเรื่อยๆ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองใช้ cell solution และ cell free filtrate เชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* การควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านซึ่งพบว่า cell solution ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้สูงสุดถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง (เมธาวี, 2556)

เปรียบเทียบความสามารถในการฆ่าแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ระหว่างกรรมวิธี cell solution กับกรรมวิธี cell free filtrate พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุในการเพาะเลี้ยง 32, 48 และ56 ชั่วโมง กรรมวิธี cell solution มีจำนวนแมลงที่ตายมากกว่ากรรมวิธี cell free filtrate อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เนื่องจากใน cell solution มีทั้งเซลล์ของแบคทีเรียที่มีชีวิตและสารที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ได้แก่ สารปฏิชีวนะ (antibiotic) เอนไซม์ lipase, phospholipase และ protease ซึ่งทั้งสองส่วนต่างมีความสามารถในการฆ่าแมลง (Boemare and Akhurst, 1988) จึงส่งผลให้ในกรรมวิธี cell solution มีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงวันผลไม้ได้มากกว่า cell free filtrate ซึ่งผ่านการกรองเพื่อแยกเอาเซลล์ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ออกไปแล้วทำให้ไม่มีการตายที่เกิดจากเซลล์ของแบคทีเรีย

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ในการฆ่าแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แต่ละกรรมวิธีมีพบว่ามีแนวโน้มในการฆ่าแมลงวันผลไม้เพศเมียสูงกว่าเพศผู้ เพราะเพศเมียต้องการสารอาหารประเภทโปรตีนในปริมาณมากเพื่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์และวางไข่

4. การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ cell solution และ cell free filtrate ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ต่อการฆ่าแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis*

จากการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ cell solution และ cell free filtrate ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ต่อการฆ่าแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง cell solution และ cell free filtrate ของแบคทีเรียมีความสามารถในการฆ่าแมลงวันผลไม้ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10,000 ppm (ml/10^3L) (ความเข้มข้น 1% หรือ 9.01×10^6 CFU/ml) และ 50,000 ppm (ml/10^3L) (ความเข้มข้น 5% หรือ 4.51×10^7 CFU/ml) ตามลำดับ และพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของ cell solution และ cell free filtrate ของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้เนื่องจากการได้รับ cell solution และ cell free filtrate มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 9) โดยที่ระดับความเข้มข้น 100,000 ppm (ml/10^3L) (ความเข้มข้น 10% หรือ 9.01×10^7 CFU/ml) cell solution ของแบคทีเรียทำให้เกิดเปอร์เซ็นการตายของแมลงวันผลไม้เท่ากับ 51.25±6.29 เปอร์เซ็น ซึ่งค่า LC_{50} ของ cell solution ของแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 102,319 ppm (ml/10^3L) (ความเข้มข้น 10.23%) และ cell free filtrate ของแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันมีค่าเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้เพียง 25.00±4.07 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่า LC_{50} ของ cell free filtrate ของแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 703,395 ppm (ml/10^3L) (ความเข้มข้น 70.34 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสูงกว่าค่า LC_{50} ของ cell solution ของแบคทีเรีย ดังนั้น cell solution ของแบคทีเรียจึงมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ ถึงแม้ว่า cell solution ของแบคทีเรียจะมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงวันผลไม้ได้ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Mahar *et al.* (2008) พบว่า cell solution ของแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 4.0×10^7 CFU/ml สามารถฆ่าด้วงงวงและตั๊กแตนได้ 92.25 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากตารางที่ 8 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000,000 ppm (ml/10^3L) (ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ หรือ 90.15×10^7CFU/ml) ของ cell solution ของแบคทีเรียก็มีความสามารถในการฆ่าแมลงวันผลไม้ได้สูงถึง 96.25±4.79 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงวันผลไม้ของ cell solution ของแบคทีเรียอาจมีความแตกต่างกันเนื่องจากวิธีการทำให้แมลงได้รับเชื้อแบคทีเรียเข้าไป เช่น วิธีการฉีดพ่นแบคทีเรียลงบนตัวแมลงโดยตรงสามารถทำเชื้อแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงได้ดีกว่าการได้รับเชื้อแบคทีเรียโดยการกินเพราะแมลงสามารถเลือกกินได้ สำหรับ cell free filtrate ของแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 1,000,000 ppm (ml/10^3L) (ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์)

มีความสามารถในการทำให้แมลงวันผลไม้ตายได้เพียง 51.25±8.45 เปอร์เซ็นต์ มีค่า LC_{50} เท่ากับ 703,395 ppm (ml/10^3L) (ความเข้มข้น 70.34 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* มีประสิทธิภาพในการนำไปใช้มากกว่า cell free filtrate ของแบคทีเรีย (ตารางที่ 9) จึงเลือก cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่ระดับความเข้มข้น 100,000 ppm (ml/10^3L) (ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หรือ 9.01×10^7 CFU/ml) ไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นการตายของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* ที่ตายจากการได้รับ cell solution และ cell free filtrate ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

ความเข้มข้น	เปอร์เซ็นต์การตาย($\overline{X}$±SD)	
(ppm; ml/10^3L)	cell solution	cell free filtrate
control	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a
1,000	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a
5,000	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a
10,000	13.75±4.79 b	0.00±0.00 a
25,000	23.75±4.79 c	0.00±0.00 a
50,000	31.25±7.50 c	13.75±4.79 b
75,000	42.50±2.89 d	20.00±4.07 bc
100,000	51.25±6.29 de	25.00±4.07 c
250,000	60.00±4.08 e	25.00±0.00 c
500,000	82.50±8.48 f	45.00±12.25 d
1,000,000	96.25±4.79 g	51.25±8.45 d
F-test	*	*
C.V.(%)	90.04	114.97

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's multiple range test

* หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นการตายของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* ที่ตายจากการได้รับ cell solution และ cell free filtrate ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

กรรมวิธี / ความเข้มข้น	เปอร์เซ็นการตาย ($\bar{X}$±SD)										
	control	**1,000**	**5,000**	**10,000**	**25,000**	**50,000**	**75,000**	**100,000**	**250,000**	**500,000**	**control (1,000,000)**
cell solution	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	13.75±4.79	23.75±4.79	31.25±7.50	42.50±2.89	51.25±6.29	60.00±4.08	82.50±8.48	96.25±4.79
cell free filtrate	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	13.75±4.79	20.00±4.07	25.00±4.07	25.00±0.00	45.00±12.25	51.25±8.45
T-test	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*	*
C.V.(%)	0.00	0.00	0.00	75.90	40.18	27.19	15.93	17.53	4.80	24.10	9.04

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี t- test แบบ dependent

* หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี t- test แบบ dependent

5. ศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของ yeast hydrolysate เมื่อผสมกับ cell solution ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* 30 มิลลิลิตร (9.02×10^8 เซลล์ : มิลลิลิตร) เพื่อใช้เป็นเหยื่อพิษในการควบคุมตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *Bcatrocera dorsalis*

จากการศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของ เหยื่อโปรตีน yeast hydrolysate เมื่อผสมกับ cell solution 30 มิลลิลิตร (9.02×10^8 เซลล์ : มิลลิลิตร) เพื่อใช้เป็นเหยื่อพิษในการควบคุมตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* พบว่า ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกยังไม่พบการตายของแมลงวันผลไม้ในทุกกรรมวิธี แต่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ค่อนข้างสูง และมีเปอร์เซ็นต์การตายสูงขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยในแต่ละกรรมวิธีมีเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่ 1 มีส่วนผสมของ ยีสไฮโดรไลเสท 0.5 กรัม กับ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* 30 มิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง สามารถทำให้แมลงวันผลไม้ตายได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จึงใช้ yeast hydrolysate 0.5 กรัม เพราะเป็นการประหยัดต้นทุน

จากการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบว่า เหยื่อโปรตีน yeast hydrolysate ที่มีคุณสมบัติในการดึงดูดแมลงวันผลไม้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงวันผลไม้ได้ ทำให้แมลงวันผลไม้มีโอกาสได้รับเชื้อแบคทีเรียที่ผสมอยู่ในเหยื่อพิษเข้าสู่ภายในตัวแมลงได้มากขึ้นทำให้แมลงวันผลไม้มีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ สัญญาณี และคณะ (ม.ป.ป.) ที่พบว่าเหยื่อโปรตีนมีประสิทธิภาพดีในการดึงดูดแมลงวันผลไม้ และการนำเหยื่อโปรตีนมาใช้ร่วมกับสารฆ่าแมลงโปรฟีโนฟอส 50 เปอร์เซ็นต์ EC 7.5 มิลลิลิตร ต่อเหยื่อโปรตีนอินไวท์ 200 มิลลิลิตร สามารถดึงดูดและฆ่าแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในธรรมชาติได้ 87.75 ตัว (วิภาดา และคณะ, ม.ป.ป.)

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นการตายของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* ที่ตายจากการได้รับ cell solution ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ผสมกับ yeast hydrolysate

yeast hydrolysate + 30 ml cellsolution	**เปอร์เซ็นการตาย ($\bar{X}$±SD)**			
	12 ชั่วโมง	**24 ชั่วโมง**	**36 ชั่วโมง**	**48 ชั่วโมง**
0.5 g	0.00±0.00 a	73.75±12.50 b	95.00±4.08 cd	100.00±0.00 d
1.0 g	0.00±0.00 a	66.24±11.09 b	91.25±2.50 bcd	100.00±0.00 d
1.5 g	0.00±0.00 a	73.75±8.53 b	90.00±4.08 bc	100.00±0.00 d
2.0 g	0.00±0.00 a	72.50±13.23 b	96.25±2.50 cd	98.75±2.50 cd
2.5 g	0.00±0.00 a	72.50±14.43 b	97.50±2.89 d	100.00±0.00 d
3.0 g	0.00±0.00 a	58.75±8.54 b	85.00±10.00 b	90.00±11.54 b
3.5 g	0.00±0.00 a	66.25±8.54 b	93.75±2.50 cd	95.00±4.08 bcd
4.0 g	0.00±0.00 a	73.75±13.15 b	90.00±0.00 bc	92.50±2.89 bc
control	0.00±0.00 a	0.25±0.50 a	0.00±0.00 a	0.25±0.50 a
F-test	ns	*	*	*
C.V.(%)	0	39.66	36.42	36.26

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's multiple range test

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

* หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

6. ศึกษาผลกระทบเหยื่อล่อโปรตีนที่มี cell solution ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ต่อตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใส *Mallada basalis*

จากผลการศึกษาในการทดลองที่ 5 พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เหยื่อโปรตีน yeast hydrolysate ผสม cell solution 30 มิลลิลิตร (9.02×10^{8} เซลล์ : มิลลิลิตร) ทำให้แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 61.25±11.09 เปอร์เซ็นต์ และยังคงมีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆจนครบ 48 ชั่วโมง แมลงวันผลไม้มีเปอร์เซ็นต์การตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แมลงช้างปีกใส *M. basalis* ไม่พบเปอร์เซ็นต์การตาย (ตารางที่ 11) แสดงให้เห็นว่าจากการทดสอบหาความเป็นพิษของ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ในเหยื่อโปรตีน yeast hydrolysate มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ล่อและฆ่าแมลงวันผลไม้เท่านั้น ไม่สามารถดึงดูดให้แมลงช้างปีกใสเข้ามากินเหยื่อพิษได้ จากการสังเกตไม่พบแมลงช้างปีกใสเข้ามากินชั่วโมง เหยื่อโปรตีน yeast hydrolysate ผสม cell solution 30 มิลลิลิตร (9.02×10^{8} เซลล์ : มิลลิลิตร) ทั้งนี้เพราะแหล่งอาหารที่สามารถดึงดูดแมลงช้างปีกใสได้นั้นคือน้ำหวานและเกสรดอกไม้ ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญที่แมลงช้างปีกใสต้องการ ((Nordlund *et al.*, 2001 อ้างโดย ประภัสสร และคณะ ม.ป.ป.) ซึ่งแตกต่างจากแมลงวันผลไม้ที่มีแหล่งอาหารที่สามารถดึงดูดให้แมลงวันเข้าหาได้คือน้ำตาลและโปรตีน (White and Elson-harris, 1992)

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นการตายของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* และแมลงช้างปีกใส *Malada basalis* ที่ตายจากการได้รับ cell solution ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ในเหยื่อโปรตีน yeast hydrolysate

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นการตาย ($\bar{X}$±SD)							
	B. dorsalis				***M. basalis***			
	12 ชั่วโมง	**24 ชั่วโมง**	**36 ชั่วโมง**	**48 ชั่วโมง**	**12 ชั่วโมง**	**24 ชั่วโมง**	**36 ชั่วโมง**	**48 ชั่วโมง**
0.5 g (yest hydrolysate)+30 ml (cell solution)	0.00±0.00	61.25±11.09	96.25±4.79	100.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
control	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
T-test	ns	*	*	*	ns	ns	ns	ns
C.V.%	0	18.10	4.97	0	0	0	0	0

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี t- test แบบ dependent

* หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี t- test แบบ dependent

7. ทดสอบระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ต่อตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis*

ผลการศึกษาพิษตกค้างของแบคทีเรีย *X. nematophilus* พบว่า ที่ทรีทเม้นต์ 0 วัน (ฉีดพ่น cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* 30 มิลลิลิตร (9.02×10^{8} เซลล์ : มิลลิลิตร) ผสมกับ yeast hydrolysate 0.5 กรัม แล้วปล่อยแมลงวันผลไว้เข้าไปในกรงทันที) มีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงวันผลไม้สูงถึง 99.75±0.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือทรีทเม้นต์ 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 12) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Steiner (1952) กล่าวว่า การใช้เหยื่อโปรตีนในการล่อแมลงจะได้ผลดีที่สุดในช่วงวันแรกคือสามารถดึงดูดได้ถึง 62 เปอร์เซ็นต์ และจากวันที่ 3 เป็นต้นไปจะได้ผลเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บผลฝรั่งในแต่ละทรีทเม้นต์มาบ่มเพื่อดูจำนวนตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย พบว่า ทรีทเม้นต์ 0 ชั่วโมง มีจำนวนตัวอ่อน จำนวนดักแด้ และตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย น้อยที่สุดเนื่องจากแมลงวันผลไม้ได้รับแบคทีเรียที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงวันผลไม้สูงเข้าสู่ภายในตัวแมลง ทำให้แมลงเริ่มมีอาการติดเชื้อและตายซึ่งการติดเชื้ออาจมีผลทำให้แมลงวันผลไม้ลดพฤติกรรมในการวางไข่ลงจึงทำให้พบตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัยน้อยกว่าทรีทเม้นต์อื่นๆ (ตารางที่ 13) มีอัตราการเข้าดักแด้ 80.78 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการฟักเป็นตัวเต็มวัยเท่ากับ 94.53 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 14) และในทรีทเม้นต์ 1, 2, 3, 4 วัน และ ชุดควบคุม มีจำนวนตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียเพิ่มจำนวนมากขึ้น ส่วนในทรีทเม้นต์ 5 พบว่า ผลฝรั่งในแต่ละทรีทเม้นต์เริ่มเหี่ยวทำให้ดึงดูดแมลงวันผลไม้ได้น้อยกว่าในกรรมวิธีอื่นๆ (ตารางที่ 14) แสดงให้เห็นว่าลักษณ์ทางกายภาพของผลฝรั่งที่ใช้ล้อแมลงวันผลไม้มีผลต่อการดึงดูดแมลงวันผลไม้ให้เข้ามาวางไข่ด้วยเช่นกัน และเมื่อระยะเวลาผ่านไปประสิทธิภาพของ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ผสมกับ yeast hydrolysate ในการฆ่าแมลงวันผลไม้ลดน้อยลงเนื่องจากเซลล์แบคทีเรียและสารที่แบคทีเรียสร้างนั้นมีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมต่ำจึงทำให้มีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ต่ำ

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* ที่ตายจากการได้รับพิษตกค้างของ cell solution ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ผสมกับ yeast hydrolysate บนผลฝรั่ง

กรรมวิธี	**เปอร์เซ็นต์การตาย ($\bar{X}$±SD)**			
(วัน)	**12 ชั่วโมง**	**24 ชั่วโมง**	**36 ชั่วโมง**	**48 ชั่วโมง**
0	0.00±0.00 a	62.25±16.94 e	91.00±4.32 g	99.75±0.50 f
1	0.00±0.00 a	46.25±7.18 d	55.00±3.37 f	77.25±2.99 e
2	0.00±0.00 a	33.00±4.32 c	39.25±2.50 e	47.75±4.79 d
3	0.00±0.00 a	17.75±2.26 b	20.00±0.82 d	24.00±5.10 c
4	0.00±0.00 a	9.25±1.26 ab	9.75±0.96 c	9.75±0.96 b
5	0.00±0.00 a	3.00±0.82 a	3.75±1.26 b	4.25±1.26 a
control	0.00±0.00 a	0.25±0.50 a	0.00±0.00 a	0.50±0.58 a
F-test	ns	*	*	*
C.V.%	0	93.75	99.68	97.27

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's multiple range test

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

* หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบจำนวนตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* ที่ได้จากการทดสอบพิษตกค้างของ cell solution ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ผสมกับ yeast hydrolysate

กรรมวิธี (วัน)	ระยะตัวอ่อน (ตัว/โมเดล)	ระยะดักแด้ (ตัว/โมเดล)	ระยะตัวเต็มวัย (ตัว/โมเดล)	
			เพศผู้	เพศเมีย
0	96.25±4.11 b	77.75±5.25 b	35.25±0.96 b	38.25±0.96 b
1	114.00±9.25 c	109.75±7.37 c	49.00±5.72 c	55.00±2.49 d
2	140.25±13.74 d	120.75±4.79 d	45.25±3.78 c	48.50±3.42 c
3	190.50±7.41 e	185.25±4.57 e	50.25±1.50 c	72.00±2.45 e
4	241.50±12.50 f	234.25±4.11 f	61.00±6.58 d	91.50±3.70 f
5	7.00±1.82 a	4.25±0.96 a	0.25±0.50 a	0.25±0.50 a
control	257.00±4.76 g	254.00±5.72 g	138.00±2.16 e	104.75±6.65 g
F-test	*	*	*	*
C.V.%	7.92	8.07	7.30	5.65

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's multiple range test

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

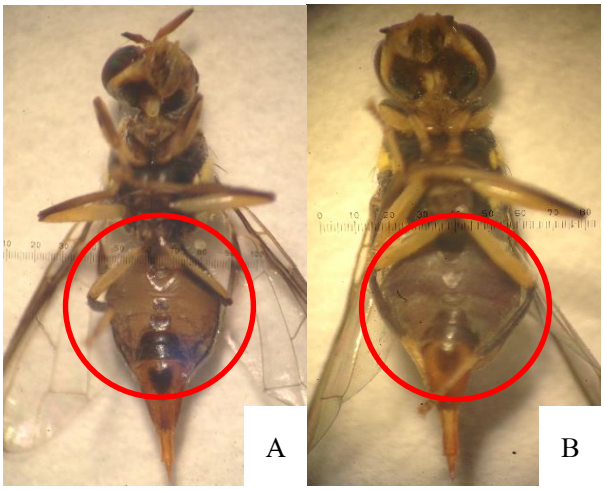
* หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 14 แสดงเปอร์เซ็นต์การเข้าดักแด้ และเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้ *Batrocera dorsalis* ที่ได้จากการทดสอบพิษตกค้างของ cell solution ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ผสมกับ yeast hydrolysate

กรรมวิธี (วัน)	เปอร์เซ็นการเข้าดักแด้	เปอร์เซ็นการฟักเป็นตัวเต็มวัย
0	94.82	94.76
1	80.78	94.53
2	86.90	77.34
3	97.24	65.99
4	97.00	65.10
5	67.86	10.53
control	98.34	96.04

8. ทดสอบแยกเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* จากซากตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *Bactrpcera papayae*

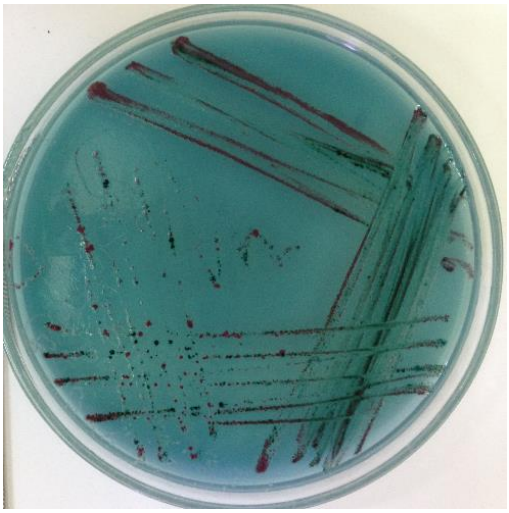
เมื่อนำซากตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ที่ตายจากการได้รับ cell solution ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ซึ่งมีลักษณะสีคล้ำลงสังเกตได้ตรงบริเวณส่วนท้องและซากแมลงจะแห้งช้ากว่าซากแมลงวันที่ตายตามปกติ (ภาพที่ 20) มาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA พบเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* (ภาพที่ 21) จากผลที่ได้สามารถยืนยันได้ว่าแมลงวันผลไม้ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* จริงและเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญอยู่ภายในตัวแมลงวันผลไม้ได้



ภาพที่ 13 เปรียบเทียบซากแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* ที่ตายจากการติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhadus nematophilus* (กำลังขยาย 3X)

A ไม่ติดเชื้อ แบคทีเรีย *X. nematophilus*

B ติดเชื้อ แบคทีเรีย *X. nematophilus*



ภาพที่ 14 โคโลนีของแบคทีเรีย Xenorhadus nematophilus ที่แยกได้จากซากแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis*

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาผลของแบคทีเรีย *X. nemotophilus* ในเหยื่อโปรตีนต่อตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และแมลงช้างปีกใส *M. basalis* พบว่าแบคทีเรีย *X. nemotophilus* ที่แยกได้จากไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* มีประสิทธิภาพในการฆ่าตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ได้ โดย cell solution ของแบคทีเรียที่มีอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์แบคทีเรีย 9.02×10^{8} CFU/ml มีประสิทธิภาพในการฆ่าตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ได้สูงที่สุดเท่ากับ 74.25 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง และ cell solution ของแบคทีเรียที่มีอายุในการเพาะเลี้ยงน้อยลงประสิทธิภาพในการฆ่าตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ลดลงตามไปด้วย

cell solution ของแบคทีเรียที่มีอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆหลังการทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100,000 ppm มีจำนวนเซลล์แบคทีเรีย 9.01×10^{7} CFU/ml มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ควบคุมตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ แม้ว่าจะมีเปอร์เซ็นต์การตายเพียง 51.259 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำ cell solution ของแบคทีเรียที่มีอายุในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง มาผสมกับเหยื่อโปรตีน yeast hydrolysate ในอัตราส่วน yeast hydrolysate 0.5 กรัม : cell solution 30 มิลลิลิตร พบเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้สูงถึง 73.75 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง พบเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้เท่ากับ 100.00 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาระยะเวลาในการออกฤทธิ์ ของแบคทีเรีย *X. nemotophilus* ในเหยื่อล่อโปรตีน พบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ของ cell solution ของแบคทีเรียลดลง เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมต่ำเมื่อมีการฉีดพ่นทิ้งไว้จะทำให้เซลล์แบคทีเรียและสารที่แบคทีเรียสร้างนั้นเสื่อมสภาพเนื่องจากไม่มีแหล่งอาหารให้แบคทีเรียสามารถตั้งตัวเองได้ในธรรมชาติและสารที่แบคทีเรียสร้างและมีความเป็นพิษต่อแมลงนั้นเป็นสารกลุ่มเอนไซม์ซึ่งจะมีประสิทธิภาพลดลงเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมมีอุณหภูมิที่สูงและมีแสงแดดส่องถึง

ในการทดลองสามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *X. nemotophilus* ได้จากซากของแมลงวันผลไม้ที่ตายในการทดลอง ผลที่ได้จึงสามารถยืนยันได้ว่าแมลงได้รับเชื้อแบคทีเรีย *X. nemotophilus* เข้าเข้าสู่ภายในตัวแมลงวันผลไม้ เชื้อสามารถเจริญเติบโตภายในตัวแมลงวันผลไม้ได้และแมลงตายเนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *X. nemotophilus* จริง ในส่วนของ cell free filtrate แบคทีเรีย *X. nemotophilus* มีประสิทธิภาพในการฆ่าตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ต่ำมากจึงไม่เหมาะแก่การนำไปใช้

จากการทดสอบใช้เหยื่อโปรตีน yeast hydrolysate ผสม cell solution กับแมลงศัตรูธรรมชาติโดยทดสอบกับแมลงช้างปีกใส *M. basalis* พบว่า เหยื่อโปรตีน yeast hydrolysate ผสม cell solution ไม่สามารถดึงดูดแมลงช้างปีกใสได้จึงไม่มีผลในการฆ่าแมลงศัตรูธรรมชาติชนิดนี้ที่มีโอกาสพบได้ในแปลงปลูกฝรั่ง

จากการศึกษาจะเห็นได้ว่า cell solution ของแบคทีเรียที่ผสมกับเหยื่อโปรตีน yeast hydrolysate มีประสิทธิภาพในการดึงดูดและฆ่าตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการใช้แบคทีเรียเป็นเหยื่อพิษในการควบคุมและกำจัดแมลงวันผลไม้โดยชีววิธีต่อไปเพื่อลดการใช้สารเคมี และหากในอนาคตมีการนำส่วนออกฤทธิ์ของแบคทีเรียไปพัฒนาให้มีอายุในการใช้งานได้นานขึ้นเชื่อได้ว่าประสิทธิภาพโดยรวมจะดีขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2555. แมลงวันผลไม้ในมะม่วง. ข่าวเตือนการระบาดศัตรูพืชประจำสัปดาห์ ปีที่ 10 ฉบับที่ 13 ประจำวันที่ 29 กุมภาพันธ์ 2555. [ออนไลน์] จาก http://www.agriqua.doae.go.th/forecast/week55/290255bph/fruit%20fly290255.html (3 เมษายน 2556)

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2556. ซาอุดิอาระเบียแจ้งเตือนพบสารพิษตกค้างในพริกจากไทย. สำนักพัฒนา ระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตร (ออนไลน์) จาก http://www.doa.go.th/psco/index.php?option=com_content&view=article&ID=175:2013-01-22-09-50-36&catid=42:201 (20 กุมภาพันธุ์ 2556)

ณัฏฐิณี ศิริมาจันทร์, อรพรรณ เกินอาษา, วีรวรรณ อมรศักดิ์ และวิวัฒน์ เสือสะอาด. ม.ป.ป. ชีววิทยาและประสิทธิภาพของแมลงช้างปีกใส *Mallada basalis* (Walker) (Neuroptera: Chrysopidae) ในการควบคุมเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch (Homoptera: Aphididae) โดยชีววิธี.นครปฐม:ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน.

ทวีศักดิ์ นวลพลับ. 2541. การปลูกพริก. กรุงเทพมหานคร: ฐานเกษตรกรรม.

บรรหาร วิสมิตะนันท์. 2538. การใช้เหยื่อโปรตีนควบคุมแมลงวันผลไม้ในมะระ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขากีฏวิทยา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประภัสสร บุษหมั่น. 2554. ศักยภาพของแบคทีเรียร่วมอาศัยในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในการเป็นตัวควบคุมโดยชีววิธี. ว. กีฏวิทยา 29: 56-65.

ประภัสสร เชยคำแหง, รจนา ไวยเจริญ, อัมพร วิโนทัย. ม.ป.ป. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมแมลงศัตรูพืชของแมลงช้างปีกใสสกุล *Mallada basalis* และ *Plesiochrysa ramburi* ในห้องปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร: กองกีฏและสัตววิทยากรมวิชาการเกษตร. หน้า 729-734.

พิมลพร นันทะ. 2545. แมลงช้างปีกใส. ใน : ศัตรูธรรมชาติหัวใจของ IPM. กรุงเทพมหานคร: กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 14-17

เมธาวี เมธวลี. 2556. ผลของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* MM 1 ที่มีต่อลูกน้ำยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* L. (Diptera : Culicidae). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มนตรี จิรสุรัตน์. 2544. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแมลงวันผลไม้. เอกสารวิชาการเรื่องแมลงวันผลไม้ในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: กองกีฏและสัตววิทยากรมวิชาการเกษตร. หน้า 7-13.

ยุพิน ยานู. ม.ป.ป. แมลงช้างปีกใส. นครราชสีมา: ศูนย์บริหารศัตรูพืช.

ยุวรินทร์ บุญทบ, ศิริณี พูนไชยศรี, ชลิดา อุณหวุฒิ, ลักขณา บำรุงศรี และสิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์. ม.ป.ป. อนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera*. กรุงเทพมหานคร: กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักพืช. หน้า 2009-2025.

วัชรี สมสุข. 2544. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง. *ใน* การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กรุงเทพฯ : กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์การเกษตร, หน้า 209-244.

วิภาดา ปลอดครบุรี, สัญญาณี ศรีคชา, เกรียงไกร จำเริญมา และศรุต สุทธิอารมณ์. ม.ป.ป. การใช้เหยื่อโปรตีนเพื่อป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้ในฝรั่ง. กรุงเทพมหานคร: กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. หน้า 320-334.

ศิริพรรณ โสบานบัว, ประภัสสร บุษหมั่น และอังศุมาลย์ จันทราปัตย์. 2009. ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* spp. ต่อการทำลายไรไข่ปลา. ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 28: 1-4

สัญญาณี ศรีคชา. ม.ป.ป. แมลงวันผลไม้และการป้องกันกำจัด. กรุงเทพมหานคร: กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

สัญญาณี ศรีคชา, วิภาดา ปลอดครบุรี, เกรียงไกร จำเริญมา และศรุต สุทธิอารมณ์. ม.ป.ป. การใช้เหยื่อโปรตีนเพื่อป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้ในชมพู่. กรุงเทพมหานคร: กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. หน้า 385-388.

แสน ติกวัฒนานนท์. 2529. การเลี้ยงแมลงวันทองในสกุลดาคัสสี่ให้ได้ปริมาณมากด้วยอาหารกึ่งเทียม.ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย์) 20: 22-36.

ฤทธิพร เบ็ญอาหลี. 2559. ผลของสารกาจัดศัตรูพืชในดินต่อการเข้าทาลายดักแด้แมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) ของเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium guizhouense* PSUM04. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Abdel-Razek, A. S. 2003. Pathogenic effects of *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae) against pupae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). J. Pest Science 76: 108-111.

Akhurst, R.J. 1983. Taxonomic study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes. J. Syst. Bacteriol. 33 : 38-45.

Akhurst, R.J. and Boemare, N.E. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. *In* Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. (eds. R. Gaugler and H. Kaya) pp. 75-87. CRC Press, Inc.

Akhurst, R.J. and Dunphy, G. 1993. Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematode, and their insect hosts. *In* Parasites and Pathogens of Insects. Vol. 2. (eds. N. Beckage, S. Thompson, and B. Federici) . Academic Press.

Anonymous. 2002. Protein bait spray for control of fruit flies. [online] Available from http://www.spc.int/pacifly/Control/Bait_spraying_1.htm (6 April, 2013)

Boemare, N.E. and Akhurst, R.J. 1988. Biological and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). J. Gen. Microbiol.134 : 751-761.

Brunel, B., Givaudan, A., Lanois, A., Akhurst, R. J. and Boemare, N. 1997. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR amplified 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 574-580.

Busvine, J.R. 1980. Recommended methods for measurement of pest resistance to pesticide. FAO Plant Protection Paper 21. Food and Agricultural Organization.

Campos-Harrera, R., Tailliez, P., Pages, S., Ginibre, N., Gutierrez, C. and Boemare, N.E. 2009. Characterization of *Xenorhabdus* isolate from La Rioja (Northern spain) and virulence with and without their symbiotic entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae). J. Invert. Pathol. 102 : 173-181.

Chang, C.P. and Huang, S.C. 1995. Evaluation of the effectiveness of releasing green Lacewing, *Mallada basalis* (Walker) for the control of tetranychid mites on Strawberry. Plant Protection Bulletin (Taipei). 37 : 41-58.

Cheng, L.L., Nechols, J.R., Margolies, D.C., Campbell, J.F. and Yang, P.S. 2010. Assessment of prey preference by the mass-produced generalist predator, *Mallada basalis* (Walker) (Neuroptera: Chrysopidae), when offered two species of spider mites, *Tetranychus kanzawai* Kishida and *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae), on papaya. Biol. Control. 53 : 267–272.

Drew, R.A.I. 2001. Fruit Flies-Lessons in Research and Politics. Professorial Lecture. Tropical Fruit Fly Research Group, Australian School of Environmental Studies. Griffith University.

Forst, S., Dowds, B., Boemare, N. and Stackbrandt, E. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. bugs that kill bugs. Annu. Rev. Microbiol. 51 : 47-72.

Goodrich-Blair, H . 2007. They've got a ticket to ride: *Xenorhabdus nematophila – Steinernema carpocapsae* symbiosis. Curr. Opin. Microbiol. 10 : 225–230.

Goodrich-Blair, H. and Clarke, D. J. 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. Mol. Microbiol. 64: 260–268.

Guagler, R. A. and Kaya, H. K. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press.

Hendrichs, J. 1996. Action programs against fruit flies of economic importance: session overview. *In* Fruit Fly Pests. St. Lucie press: Florida. A world assessment of their biology and management. (eds. B. A. McPheron and and G. J. Steck) pp. 513-519. St. Lucie press.

Integrated Taxonomic Information System. 2013. *Bactrocera papayae* Drew & Hancock. [online] Available from http://www.itis.gov (1 April, 2013)

Lacey, L. A . 1997. Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic press.

Mahar, A. N., Munir, M. and Mahar, A. Q. 2004. Microbial control of diamondback moth, *Plutella xylostella L.* (Lepidoptera: *Yponomeutidae*) using bacterial (*Xenorhabdus nematophila*) and its metabolites from the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. J. Zhejiang Univ Sci. 5: 1183-1190.

Mahar, A. N., Munir, M. and Mahar, A. Q. 2005. Pathogenicity of bacterium, *Xenorhabdus nematophila* isolated from entomopathogenic nematode (*Steinernema carpocapsae*) and it secretion against *Galleria mellonella* larvae. J. Zhejiang Univ. Sci. 6: 457-463.

Mahar, A. N., Jan, N. D., Mahar, G. M. and Mahar, A. Q. 2008. Control of insects with entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila* and it toxic secretions. J. Agri. Biol. 10: 52-56.

Meksongsee, B., Liewvanich, A., and Jirasuratana, M. 1988. Fruit flies in Thailand. *In* Proceedings of the First International Symposium on Fruit Flies in the Tropics, Kuala Lumpur, Malaysia, 14-16 March 1988, pp. 83-98

Mohd Noor, M.A.Z. , Nur Azura, A. and Muhamad, R. 2011. Growth and Development of *Bactrocera Papayae* (Drew & Hancock) Feeding on Guava Fruits. Aust. J. Basic Appl. Sci. 5: 111-117.

Piyarat Namsena, Prapassom Bussaman and Paweena Rattanasena. Bioformulation of *Xenorhabdus nematophilus* stockiae PB09 for controlling mushroom mite, *Luciaphorus* perniciosus Rack. Bioresourees and Bio. Processing. 2016. 3:19 DOI. 10.1186/540643-016-0097-5

Nishimura, Y., Hagiwara, A., Suzuki, T., and Yamanaka, S. 1994. *Xenorhabdus japonicus* sp. nov. associated with the nematode *Steinernema kushidai* Wor. J. Microbiol. Biotech. 10 : 207-210

Rahoo, A.M., T. Mukhtar, S.R., Gowen and Pembroke, B. 2011. Virulence of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus bovienii* and *Photorhabdus luminescens* against *Galleria mellonella* Larvae. Pakistan J. Zool. 43 : 543 – 548.

Ratcliffe, N. A. and Rowley, A. F. 2009. Roles of haemocytes in defense against biological agents. *In* Insect Hemocytes (ed. A. P. Gupta) pp. 331-414. Cambridge: Cambridge University Press.

Sneath, P.H.A. (ed.) 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol 2. London : Academic Press.

Shrestha, S. and Kim, Y. 2007. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits hemocyte phagocytosis of *Spodoptera exigua* by inhibiting phospholipase A2. J. Invert. Pathol. 96: 64–70.

Shrestha, S. and Kim, Y. 2010. Differential pathogenicity of two entomopathogenic bacterial, *Photorhabdus temperate* subsp. *temperate* and *Xenorhabdus nematophila* against the red flour beetle, *Tribolium castaneum.* J. Asian-Pacific Entomol. 13: 209-213.

Steiner, L.E. 1952. Fruit fly control in Hawaii with poison-bait sprays containing protein hydrolysate. Journal of Economic Entomology. 45: 838-843

Thanwisai, A., Tandhavanant, S., Saiprom, N., Waterfield, N.R., Long, P.K., Bode, H.B., Peacock, S.J. and Chantratita, N. 2012. Diversity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. and their symbiotic entomopathogenic nematodes from Thailand. PLoS one 7: e43835. doi: 10.1371/journal.pone.0043835.

UH-CTAHR. n.d. Hawaii area-wide integrated pest management: Protein bait. Hawaii Area-wide integrated pest management Program. University of Hawaii-College of Tropical Agriculture and Human Resourees. [online] Available from www.extento. Hawaii.edu/ fruitfly (5 April, 2556)

Qin-Ying Wang, Zi-Yan Nangong, Jun Yang, Ping Song, Yi Wang, Liwang Cui and Long Cui. Toxic activity of a protein complex purifiled from *Xenorhabdus nematophilus* HB310 to *Plutella xylostella* larvae

White, I. M. and Elson-Harris, M. M. 1992. Fruit Flies of Economic Significance: their identification and bionomics. Wallingford: CAB International.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient agar, containing bromothymol blue and triphenyltetrazolium chloride (NBTA)

ส่วนผสมที่ 1	Beef extract	3.000	กรัม
	Peptone	5.000	กรัม
	Agar	15.000	กรัม
	Bromothymol blue (BTB)	0.025	กรัม
	น้ำกลั่น	1,000.000	มิลิลิตร
ส่วนผสมที่ 2	Triphenyltetrazolium chloride	0.040	กรัม
	น้ำกลั่น	50.000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมที่ 1 ให้เข้ากันต้มให้วุ้นละลาย เทใส่ขวดแก้วปิดจุกนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที ละลายส่วนผสมที่ 2 แล้วนำเข้าตู้ปลอดเชื้อเพื่อดูดใส่ส่วนผสมที่ 1 ขณะที่ยังอุ่น (<50 องศาเซลเซียส) โดยดูดผ่าน disposable filter (0.2 ไมครอน) เขย่าให้ส่วนผสมที่ 1 และ 2 เข้ากัน เทใส่ pestri dish

2. Trypticase Soy broth (TSB)

Pancreatic Digest of Casein	17.0	กรัม
Enzymatic Digest of Soybean Meal	3.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบต่างๆ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

ภาคผนวก ข

บริษัทผู้ผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อ

รายการ	บริษัทผู้ผลิต
Corn meal agar	Difco
Corn starch agar	บริษัทวิทยาศรม จำกัด
Malt extract	Difco
Peptone	Difco
Potato dextrose broth (PDB)	Difco
Sabouraud dextrose broth (SDB)	Difco
Sabouraud dextrose agar (SDA)	Difco
Skim milk agar	Difco
Urea	Merck
Urea agar base	Merck
Yeast extract	Difco
Yeast Mold Broth (YM)	Difco
Yeast nitrogen base	Difco

ภาคผนวก ค

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในห้องปฏิบัติการ

เก็บตัวอย่างผลฝรั่งที่ถูกทำลายโดยแมลงวันจากพื้นที่ปลูกฝรั่งของเกษตรกรมาวางในกล่องพลาสติกขนาด 16.5×23.5×9.5 เซนติเมตร ภายในกล่องบรรจุเวอมิคูไลท์สูงประมาณ 2 เซนติเมตร ทิ้งไว้ประมาณ 11-14 วัน เมื่อแมลงวันผลไม้เข้าสู่ระยะดักแด้ จึงย้ายดักแด้ไปไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 30×30×30 เซนติเมตร ที่บุด้วยผ้ามุ้งสีขาว เมื่อดักแด้ฟักกลายเป็นตัวเต็มวัยให้อาหารตัวเต็มวัยด้วยยีสต์ไฮโดรไลเซท น้ำตาล อัตราส่วน 1:1 (ยีสต์ไฮโดรไลเซท 2 กรัม : น้ำตาล 2 กรัม ต่อแมลงวันจำนวน 50 ตัว) และน้ำ เปลี่ยนอาหารทุกๆ 5 วัน เมื่อตัวเต็มวัยที่มีอายุ 11 วัน จะมีผนังลำตัวแข็งแรงและสีไม่เปลี่ยนแปลงจึงนำตัวเต็มวัยไปทำให้สลบด้วยความเย็นและคัดเลือกเฉพาะแมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการ ตัวเต็มวันมีอายุประมาณ 7-10 วัน เริ่มล่อให้แมลงวางไข่ด้วยการนำผลฝรั่งสดไปวางในกรงเลี้ยงแมลง แมลงวันผลไม้เพศเมียจะใช้อวัยวะวางไข่ เปลี่ยนผลฝรั่งสดทุกวันเพื่อให้ได้ไข่ที่มีอายุเท่ากัน นำผลฝรั่งที่ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่แล้ววางบนอาหารเทียมในกล่องขนาด 14×20×7 เซนติเมตร บันทึกวันที่เก็บไข่แต่ละกล่อง เมื่อตัวหนอนอายุได้ประมาณ 6-8 วัน นำไปวางในกล่องพลาสติกขนาด 16.5×23.5×9.5 เซนติเมตร ซึ่งด้านล่างรองด้วยเวอมิคูไลท์ที่อบฆ่าเชื้อแล้วสูงประมาณ 2 เซนติเมตร เพื่อให้ตัวหนอนเข้าดักแด้ หลังจากนั้น 1-2 วัน เก็บดักแด้โดยการร่อนด้วยตะแกรงออกจากเวอมิคูไลท์แล้วนำใส่ในจานแก้ว (petri dish) วางไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 30×30×30 เซนติเมตร เพื่อรอให้ดักแด้ฟักเป็นตัวเต็มวัย (F1) เมื่ออายุครบ 4 วัน จึงนำไปศึกษาหัวข้อถัดไปหรือนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณตามขั้นตอนข้างต้นต่อไป อาหารเทียมเพื่อเลี้ยงหนอนแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (แสน ,2529) มีส่วนผสม ดังนี้

ข้าวโพด	150.0	กรัม
กล้วยน้ำว้า	150.0	กรัม
ทิชชูหยาบ	30.0	กรัม
น้ำตาลทราย	30.0	กรัม
Brewer’s yeast	30.0	กรัม
Sodium benzoate	0.6	กรัม
conc.HCI	6.0	มิลลิลิตร
H2O	300.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

การคำนวณการเจริญเติบโต

กำหนดให้

No เป็นจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น

Nt เป็นจำนวนแบคทีเรียสุดท้ายที่เวลา t

td เป็นเวลาในแต่ละรอบการแบ่งเซลล์ (generation time)

t เป็นเวลาทั้งหมดที่แบคทีเรียใช้ในการเจริญ (การทดลอง)

n เป็นจำนวน generation

R อัตราการเจริญ

ดังนั้นจำนวนแบคทีเรียสุดท้ายจะได้

$$Nt = No \times 2n$$

Taking the logarithms

$$\text{Log } Nt = \log No + n\log 2$$

$$n = \text{Log } Nt - \log No$$

$$\log 2$$

$$\log 2 = 0.301$$

$$n = 3.3(\log Nt / No)$$

เนื่องจาก $td = t / n$

ดังนั้น $td = \dfrac{t}{3.3 \log Nt / No}$

ค่า μ = specific growth rate (h^{-1}) หาได้จากสูตร

$$td = \frac{0.693}{\mu}$$

ภาคผนวก จ

ผลการคำนวน Probit Analysis ของ Cell free filtrate

Prob	CONCEN	Lower	Upper
.01	6048.25286	1266.53080	14387.67555
.02	10560.17662	2788.83029	22357.92305
.03	15039.67979	4588.55383	29657.90049
.04	19622.81769	6659.61049	36758.33519
.05	24362.97042	9000.86774	43846.37544
.06	29289.53686	11613.78814	51025.30068
.07	34422.41257	14501.17229	58364.48069
.08	39777.11516	17666.44650	65917.47267
.09	45367.00126	21113.21185	73730.09471
.10	51204.36304	24844.93195	81844.57842
.15	84517.75575	47865.13537	128409.73979
.20	125869.96593	78192.61879	189343.26799
.25	177140.77502	115618.66002	272230.44974
.30	240759.32510	160033.01884	387172.19858
.35	319942.99652	211934.27873	547627.89522
.40	419036.69782	272629.02914	772253.34675
.45	544032.10978	344258.09114	1088152.82550
.50	703395.41031	429915.21353	1536264.14994
.55	909440.99503	533992.38999	2180661.72825
.60	1180720.22287	662863.73294	3125656.62101
.65	1546416.41986	826152.95406	4549358.81162
.70	2055019.48070	1039170.87483	6774803.31374
.75	2793061.63797	1327993.15655	10436069.2060
.80	3930763.78133	1741321.07165	16920100.4607
.85	5853978.24217	2383114.85474	29780719.6779
.90	9662557.52135	3528527.06219	60796172.6615
.91	10905836.6108	3878210.89925	72254832.7512
.92	12438436.0531	4296999.90055	87173066.9763
.93	14373341.8506	4809274.57413	107168242.552
.94	16892213.2709	5453170.32396	134986048.777
.95	20308077.9817	6292394.37247	175656169.278
.96	25213764.4574	7443357.50133	239399852.613
.97	32897316.3080	9148382.22853	350378044.160
.98	46851972.3909	12029749.7517	581550298.668
.99	81802979.2553	18508408.4515	1293367532.96

ผลการคำนวน Probit Analysis ของ Cell solution

Prob	CONCEN	Lower	Upper
.01	2120.55921	797.51886	4134.07145
.02	3339.81198	1398.81617	6074.22756
.03	4455.37776	1996.11153	7760.99589
.04	5534.00334	2606.68906	9337.71767
.05	6601.26477	3237.17822	10858.74074
.06	7670.35286	3891.10974	12351.82046
.07	8749.28644	4570.77589	13833.61674
.08	9843.51420	5277.88652	15315.26309
.09	10957.06138	6013.85095	16804.81750
.10	12093.10578	6779.91568	18308.49401
.15	18193.75962	11101.10847	26193.70342
.20	25171.09507	16341.83330	35000.75863
.25	33254.47556	22650.23828	45120.35947
.30	42703.66396	30195.16909	56999.61201
.35	53841.00484	39174.16808	71214.69206
.40	67083.89691	49826.61876	88542.07801
.45	82989.01269	62458.35578	110051.45050
.50	102319.38216	77484.21295	137244.54010
.55	126152.31374	95496.27427	172283.56830
.60	156062.13186	117371.89909	218394.32339
.65	194447.63330	144454.48582	280618.42888
.70	245160.60202	178885.78563	367308.86184
.75	314822.46498	224284.41621	493369.36559
.80	415923.73854	287308.10036	688161.70355
.85	575431.14690	381881.24714	1018415.54646
.90	865721.02803	543892.61404	1675045.19214
.91	955480.26970	592065.22165	1889994.72955
.92	1063568.94029	649117.11586	2155306.47594
.93	1196583.97747	718059.85237	2490750.87799
.94	1364898.87137	803556.66753	2928165.68289
.95	1585946.98661	913309.46241	3522512.75148
.96	1891805.13948	1061207.72625	4378105.61059
.97	2349802.08736	1275712.06140	5722182.26334
.98	3134684.23596	1628456.77415	8173134.92587
.99	4937025.99924	2390054.66924	14351253.2743

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวเอื้อมพร อุยยะพัฒน์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5410620031

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2553

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. ทุนเรียนดีจากภาควิชาการจัดการศัตรูพืช
2. ทุนสนับสนุนการทำวิจัยจาก สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

เอื้อมพร อุยยะพัฒน์ และจิราพรเพชรรัตน์. 2558. “การศึกษาความสามารถของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่มีอายุการเพาะเลี้ยงต่างกันในการฆ่าตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *Bactrocera papayae* Drew & Hancock (Diptera: Tephritidae) ” การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยแม่โจ้ประจำปี 2558. หน้า 17-25