การคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงและแนวทางการควบคุมแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae)

Screening Insecticidal Properties of *Streptomyces* spp. and Controlling Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae)

เบญจวรรณ ศิริกุล

Benjawan Sirikun

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
2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงและแนวทางการควบคุมแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae)

Screening Insecticidal Properties of *Streptomyces* spp. and Controlling Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae)

เบญจวรรณ ศิริกุล

Benjawan Sirikun

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
2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงและแนวทางการควบคุม แมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae)

ผู้เขียน นางสาวเบญจวรรณ ศิริกุล

สาขาวิชา กีฏวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นริศ ท้าวจันทร์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ดร.จารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ งามผ่องใส)

.....กรรมการ

(ดร.กราญ์จนา ถาอินชุม)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นริศ ท้าวจันทร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากีฏวิทยา

.....

(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นริศ ท้าวจันทร์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ .....
(นางสาวเบญจวรรณ ศิริกุล)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ .....
(นางสาวเบญจวรรณ ศิริกุล)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงและแนวทางการควบคุมแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae)
ผู้เขียน นางสาวเบญจวรรณ ศิริกุล
สาขาวิชา กีฏวิทยา
ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

การคัดกรองเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงจำนวน 52 ไอโซเลท โดยเทคนิค brine shrimp bioassay พบเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ K4H–9, K4H–10, K5–4, K5H–10, K6–5, K8–4, K8–10, NRST9, NRST15 และ NRST17 มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของอาร์ทีเมียมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แตกต่างจากไอโซเลทอื่นๆและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ส่วนใหญ่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิด การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ในการฆ่าแมลง พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลท K5–4, K8–4, NRST9, NRST15 และ NRST17 เหมาะสำหรับการเลี้ยงที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ เชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลท K8–10 เหมาะสำหรับการเลี้ยงที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์ และเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลท K4H–9, K4H–10 และ K5H–10 เหมาะสำหรับการเลี้ยงที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ การคัดกรองเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ส่งผลต่อการเจริญของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* เบื้องต้น พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ K8–10, NRST15 และ NRST17 ทำให้แมลงมีความผิดปกติและส่งผลต่อการรอดชีวิต 60.38, 73.33 และ 77.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูวิทยาของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่าเชื้อไอโซเลท K8–10 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *S. hygroscopicus* ส่วนเชื้อไอโซเลท NRST15 และ NRST17 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *S. albidoflavus* การศึกษาสารทุติยภูมิในสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 โดยวิธี LCMS พบมวลโมเลกุลที่มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) เท่ากับ 609.3740 m/z, 700.4400 m/z, 729.4539 m/z, 591.3637 m/z และ 761.4827 m/z มีความใกล้เคียงกับสารที่ออกฤทธิ์ควบคุมแมลง คือ allosamidin, moxidectin, avermectin, spinosyn A และ spinosyn Q ตามลำดับ สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของเชื้อ *Streptomyces* sp. K8–10 ส่งผลต่อแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะไข่ ระยะหนอน และตัวเต็มวัย แต่ไม่ส่งผลต่อระยะดักแด้ โดยทำให้ระยะไข่ มีการฟัก 53.00 เปอร์เซ็นต์ และรอดชีวิตเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์เพียง

36.17 เปอร์เซ็นต์ ออกฤทธิ์ฆ่าระยะหนอน 68.00 เปอร์เซ็นต์ และรอดชีวิตเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์เพียง 19.33 เปอร์เซ็นต์ และในระยะตัวเต็มวัย ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของตัวเต็มวัยสูงสุด 28.33 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากความเข้มข้นอื่นๆ และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 มีศักยภาพในการนำไปใช้ควบคุมและการจัดการแมลงศัตรูพืชในอนาคต

Thesis Title Screening Insecticidal Properties of *Streptomyces* spp. and Controlling Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae)

Author Miss Benjawan Sirikun

Major Program Entomology

Academic Year 2018

ABSTRACT

The screening insecticidal activity of 52 isolates of *Streptomyces* spp. by brine shrimp bioassay were investigated. Ten isolates (K4H–9, K4H–10, K5–4, K5H–10, K6–5, K8–4, K8–10, NRST9, NRST15 and NRST17) showed insecticidal activity with percentage cumulative mortality of brine shrimp more than 90% at 24 hours and significantly different from other isolates and control (P<0.05). The most screened isolates of *Streptomyces* spp. showed chitinase and protease activities. The cultivation time of *Streptomyces* spp. for produce secondary metabolite were tested. Isolates K5–4, K8–4, NRST9, NRST15 and NRST17 were suitable at 1 week, isolates K8–10 was suitable at 2 weeks and isolates K4H–9, K4H–10 and K5H–10 were suitable at 3 weeks, respectively. The preliminary screening effects of *Streptomyces* spp. on *Bactrocera dorsalis* were studied. Three isolates of *Streptomyces* spp. i.e. K8–10, NRST15 and NRST17 had an effects on survival rate of *B. dorsalis* with 60.38, 73.33 and 77.50%, respectively. Three selected isolates were studied on morphological and molecular identifications. Isolate K8–10 was similar to bacterial species *S. hygroscopicus* and isolates NRST15 and NRST 17 were similar to bacterial species *S. albidoflavus*. The crude extract of secondary metabolite of *Streptomyces* sp. isolated K8–10 were investigated by LCMS analysis. Five molecules were found i.e. 609.3740 m/z, 700.4400 m/z, 729.4539 m/z, 591.3637 m/z and 761.4827 m/z and peak similar to allosamidin, moxidectin, avermectin, spinosyn A and spinosyn Q respectively. The crude extract of *Streptomyces* sp. isolate K8–10 at concentration 50 mg/ml showed negative effect on egg, larval and adult stages of *B. dorsalis*, except on the pupal stage. The treated egg had 53.00% of hatching and 36.17% of survival to adult stage, the treated larvae had 68.00% of mortality and 19.33% of survival to adult stage, the treated adult had percentage mortality 28.33%, respectively, this concentration significantly different from other concentrations and control (P<0.05). The *Streptomyces* sp. isolates K8–10 had the potential for use in biological control and management of insect pests in future.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.นริศ ท้าวจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษา แก้ไขข้อบกพร่อง ชี้แนะแนวทาง ในการค้นคว้าวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ ช่วยหาทุนสนับสนุนงานวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.จารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ งามผ่องใส และ ดร.กราญ์จนา ถาอินชุม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณปัทมพร อินสุวรรโณ คุณสิริพร ศรีเจริญ และบุคลากรภาควิชาการจัดการศัตรูพืชทุกท่าน สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทุนโครงการเรียนดี คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้ และโครงการห้องปฏิบัติการวิจัยสู่ความเป็นเลิศ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการจัดการศัตรูพืชและสรีรวิทยาของพืช ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ และให้ความช่วยเหลือทางด้านงานธุรการ ในการทำวิจัย

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ พ่อ แม่ และครอบครัวศิริกุล ผู้เป็นแรงผลักดันสำคัญในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงรุ่นพี่ รุ่นน้อง และเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้กันเสมอมา

เบญจวรรณ ศิริกุล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(8)
สารบัญ	(9)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพ	(11)
รายการตารางภาคผนวก	(14)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	13
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	14
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	32
4. สรุปผลและข้อเสนอแนะ	65
เอกสารอ้างอิง	67
ภาคผนวก	77
ประวัติผู้เขียน	83

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ส่วนประกอบอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)	15
2.	ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract malt extract agar (GYMA)	16
3.	ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract malt extract broth (GYMB)	17
4.	ค่าเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมและค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตของอาร์ทีเมีย จากการทดสอบคุณสมบัติการฆ่าแมลงของเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay	34
5.	ดัชนีการสร้างเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) ของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท	36
6.	ดัชนีการสร้างเอนไซม์โปรติเอส (protease) ของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท	38
7.	ประสิทธิภาพน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 9 ไอโซเลท ต่อแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะหนอน	48
8.	ผลของสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ต่อการพัฒนาการแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะไข่–ตัวเต็มวัย (mean ± SE)	57
9.	ผลของสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ต่อการพัฒนาการแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะหนอน–ตัวเต็มวัย (mean ± SE)	61
10.	ผลของสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ต่อการพัฒนาการแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะดักแด้–ตัวเต็มวัย (mean ± SE)	63
11.	ผลของสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* sp.ไอโซเลท K8–10 ต่อการตายของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะตัวเต็มวัย (mean ± SE)	64

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	แนวเส้นประสีฟ้าแสดงพื้นที่การแพร่ระบาดของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)	4
2.	ลักษณะแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ในแต่ละระยะ	6
3.	การเจริญของเชื้อ *Streptomyces* spp.	8
4.	ผลไม้ในแปลงปลูกที่มีการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)	14
5.	การทดสอบคุณสมบัติการฆ่าแมลงของเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยเทคนิค brine shrimp bioassay	19
6.	การคัดกรองเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อการเจริญของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะหนอน (ทดสอบเบื้องต้น)	23
7.	การสกัดสารทุติยภูมิจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10	28
8.	เชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงโดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay	33
9.	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay	33
10.	การสร้างเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) ของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท ที่อายุ 7 วัน เชื้อ *Streptomyces* spp. สร้างเอนไซม์ไคติเนสย่อย substrate เกิดสีม่วงรอบโคโลนี	36
11	การสร้างเอนไซม์โปรติเอส (protease) ของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท ที่อายุ 7 วัน เชื้อ *Streptomyces* spp. สร้างเอนไซม์โปรติเอสย่อย substrate เกิดวงใสรอบโคโลนี	38
12.	เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GYMB ที่อายุ 14 วัน	40
13.	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. K4H–9 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ	41
14.	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. K4H–10 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ	41

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15.	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. K5–4 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ	42
16.	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. K5H–10 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ	42
17.	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. K8–4 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ	43
18.	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. K8–10 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ	43
19.	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. NRST9 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ	44
20.	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. NRST15 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ	44
21.	เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. NRST17 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ	45
22.	ลักษณะความผิดปกติของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะหนอน ระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย ที่ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในหนอนระยะที่ 2	47
23.	เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ที่อายุ 14 วัน	49
24.	เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท NRST15 ที่อายุ 7 วัน	50
25.	เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท NRST17 ที่อายุ 7 วัน	50
26.	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลท K8–10, NRST15 และ NRST17	51
27.	ลักษณะของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10	53
28.	LCMS chromatograph ของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10	54

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
29.	ลักษณะความผิดปกติของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะไข่–ตัวเต็มวัย หลังจากทดสอบสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ตั้งแต่ระยะไข่	58
30.	ลักษณะความผิดปกติของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะหนอน–ตัวเต็มวัย หลังจากทดสอบสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ตั้งแต่ระยะหนอน	60

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ **หน้า**

1. การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลง โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay 78

บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

แมลงวันผลไม้ (Oriental fruit fly) อยู่ในวงศ์ Tephritidae เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถเข้าทำลายพืชผลทางเกษตรได้มากมายหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลไม้ที่มีผิวเปลือกบาง พืชผัก และไม้ดอกบางชนิด (Diamantidis *et al*., 2008) จำนวนแมลงวันผลไม้ที่อยู่ในวงศ์นี้มีมากกว่า 4,000 ชนิด แต่มีเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนแมลงวันผลไม้ทั้งหมดที่จัดเป็นแมลงศัตรูสำคัญทางเศรษฐกิจ และมีพื้นที่การแพร่กระจายในหลายประเทศทั่วโลก ทั้งในเขตอบอุ่น เขตกึ่งร้อน และเขตร้อน (Christenson and Foote, 1960; Weems *et al*., 1999; Singh, 2003) สำหรับในทวีปเอเชีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และหมู่เกาะแปซิฟิก แมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) จัดเป็นชนิดของแมลงวันผลไม้ที่สำคัญในพื้นที่เขตนี้ (Vargas *et al*., 2015) ในประเทศไทยพบการแพร่ระบาดทั่วทุกภาคของประเทศตั้งแต่เขตเหนือสุดยาวลงมาถึงเขตชายแดนติดกับประเทศมาเลเซีย (Clarke *et al*., 2001) นอกจากนี้มีรายงานความเสียหายของผลผลิตที่เกิดจากการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในมะม่วง ฝรั่ง และมะละกอ อยู่ระหว่าง 12–90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งระดับของความเสียหายนั้นขึ้นอยู่กับพื้นที่ ฤดูกาล และการจัดการแมลงศัตรูพืชของเกษตรกร (Allwood and LeBlanc, 1997) ความเสียหายจากแมลงวันผลไม้ไม่เพียงแต่เกิดขึ้นกับผลไม้ก่อนเก็บเกี่ยวภายในแปลงเท่านั้น แต่มีผลต่อเนื่องจนถึงภายหลังการเก็บเกี่ยวในการจัดการผลผลิตให้มีคุณภาพ เพื่อการส่งออกสินค้าระหว่างประเทศ ดังนั้นแมลงวันผลไม้จัดเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย จากความเสียหายที่เกิดขึ้นและความต้องการควบคุมแมลงวันผลไม้ดังกล่าว โดยการลดการใช้สารเคมี การใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น เชื้อ *Streptomyces* spp. ควบคุมแมลงถือเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้สำหรับการควบคุมแมลงวันผลไม้

ในปัจจุบันมีวิธีการควบคุมกำจัดแมลงวันผลไม้หลากหลายวิธี ตัวอย่างการทดสอบควบคุมแมลงวันผลไม้ในสวนพุทรา โดยการใช้แมลงที่เป็นหมันจากการฉายรังสีร่วมกับการวางกับดัก การสร้างแนวกั้นแมลง การทำลายพืชอาศัยและกำจัดผลไม้ที่แมลงวันผลไม้เข้าทำลาย พบว่าประชากรแมลงวันผลไม้ลดลง 71.79–75.78 เปอร์เซ็นต์ ในพื้นที่ทดสอบ (วณิช และคณะ, 2555) ซึ่งการบูรณาการวิธีการป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้ ตามหลักการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน

(Integrate Pest Management: IPM) เป็นวิธีการที่เหมาะสม การค้นหาวิธีการใหม่เพื่อช่วยในการกำจัดตามหลัก IPM จึงเป็นแนวทางที่ดี หนึ่งในวิธีการป้องกันกำจัดแมลงตามหลัก IPM คือ การใช้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแมลง ซึ่งเชื้อ *Streptomyces* spp. เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจในการนำมาใช้ควบคุมแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะคล้ายเชื้อรา สามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงหลายชนิด เช่น นิกโกมัยซิน (nikkomycin) ที่มีผลต่อการสังเคราะห์ไคติน และสารกลุ่มแมคโครไลด์ (macrolide) ที่มีผลในการยับยั้งการลอกคราบของแมลง (Muller *et al*., 1981) จากการศึกษาของ Samri และคณะ (2015) ได้ทดสอบความเป็นพิษของเชื้อกลุ่ม Actinomycetes กับไรนางฟ้า (brine shrimp) ที่ได้รับการคัดกรองจากทั้งหมด 12 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลทที่ OS46, 37 และ B62 มีค่า LD_{50} เท่ากับ 0.26, 0.34 และ 0.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Kaur และคณะ (2014) ค้นพบสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ใน *S. hydregenans* DH16 และทำการสกัดด้วยสารเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) ทดสอบในระยะดักแด้ของหนอนในวงศ์ Noctuidae พบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการฆ่าหนอน (lavicidal insecticide) และยับยั้งการเจริญของหนอนกระทู้ในระยะต่างๆ นอกจากนี้มีรายงานสารปฏิชีวนะที่เชื้อ *Streptomyces* spp. สร้างขึ้น ได้แก่ flavenomycin (Craveri and Giolitti, 1957) antinomycin (Kido and Spyhalski, 1950) piericidins (Takahaski *et al*., 1968) macrotetralides (Oishi *et al*.,1970) และ prasinons (Box *et al*., 1973) ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าแมลง (insecticide) จากคุณสมบัติข้างต้นของเชื้อ *Streptomyces* spp. จึงเป็นที่มาของแนวคิดในการนำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพมาประยุกต์ใช้ในการทดสอบการควบคุมแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการป้องกันกำจัด ลดการใช้สารเคมีที่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและเป็นมิตรต่อสภาพแวดล้อม อีกทั้งเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับใช้ควบคุมแมลงชนิดนี้สำหรับเกษตรกรผู้ปลูกไม้ผลและผู้ที่สนใจจะต่อยอดทางการศึกษาต่อไปในอนาคต

ตรวจเอกสาร

1. แมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

1.1 ความสำคัญของแมลงวันผลไม้

แมลงวันผลไม้หรือแมลงวันทอง (fruit flies) ชื่อสามัญ Oriental fruit fly เป็นแมลงศัตรูที่มีความสำคัญสำหรับไม้ผล ตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้จะเข้าทำลายผลไม้ โดยการวางไข่ลงบริเวณผิวผลไม้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลไม้ที่มีเปลือกบางหรืออ่อนนุ่ม แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จัดอยู่ในลำดับขั้นอนุกรมวิธานดังนี้

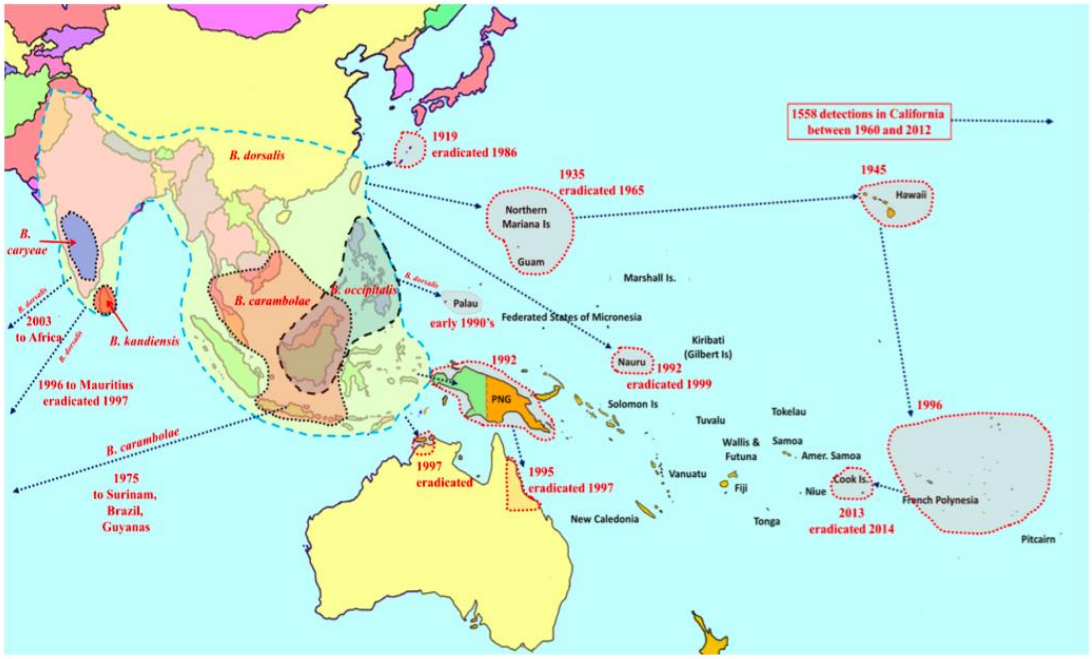
อาณาจักร: Animalia
ไฟลัม: Arthropoda
ชั้น: Insecta
อันดับ: Diptera
วงศ์: Tephritidae
สกุล: *Bactrocera*
สกุลย่อย: *Bactrocera*
ชนิด: *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

แมลงวันผลไม้เป็นศัตรูพืชที่สำคัญของพืชผักและผลไม้ มากกว่า 4,000 ชนิด ซึ่งกระจัดกระจายอยู่ในเขตหนาว เขตอบอุ่น และเขตร้อนของโลก ซึ่งคาดว่ามีมากกว่า 800 ชนิด ที่พบในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะแมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* ซึ่งมีเขตแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย จัดเป็นแมลงวันผลไม้ที่สำคัญที่สุดของประเทศ พบการทำลายผลไม้ได้ทั่วไป มีพืชอาศัยมากมาย เช่น ฝรั่ง มะละกอ ชมพู่ ละมุด และ มะม่วง เป็นต้น (มนตรี, 2544; White and Elson–Harris, 1992; Allwood *et al*., 1999; Clarke *et al*., 2001)

จากรายงานการศึกษาพบแมลงวันผลไม้เข้าทำลายพืช 359 ชนิด โดยเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ 106 ชนิด และเป็นพืชที่ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ 253 ชนิด ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าแมลงวันผลไม้สามารถขยายพันธุ์ และเพิ่มปริมาณได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆตลอดทั้งปี จึงทำให้การควบคุมและป้องกันกำจัดทำได้ยาก ก่อให้เกิดปัญหาต่อผลผลิต โดยเฉพาะผลไม้ที่เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด (Clarke *et al*., 2001)

1.2 การแพร่ระบาด

แมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* มีพื้นที่การแพร่ระบาดทั่วทั้งทวีปเอเชีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และหมู่เกาะแปซิฟิค นอกจากนี้ยังพบได้ในเกาะฮาวาย เกาะมาเรียนา เกาะตาฮิติ และหมู่เกาะเฟรนโพลีนีเซีย (White and Elson–Harris, 1992; Allwood *et al*., 1999; Vargas *et al*., 2015) (ภาพที่ 1) สำหรับประเทศในเขตเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบรายงานการระบาดของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้แก่ อินเดีย ศรีลังกา พม่า จีน ไต้หวัน ลาว เวียดนาม กัมพูชา ไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย (White and Elson–Harris, 1992; Vargas *et al*., 2015) สำหรับในประเทศไทย พบรายงานการแพร่ระบาดทั่วทั้งประเทศ (Allwood *et al*., 1999) สามารถพบการแพร่ระบาดได้ตลอดทั้งปี (ขึ้นอยู่กับการปรากฏของพืชอาหาร) เพราะแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เป็นแมลงที่มีพืชอาหารกว้าง วงจรชีวิตสั้น มีประมาณ 10 รุ่นต่อปี ซึ่งขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และบินไปได้ไกลถึง 50–100 กิโลเมตร (CABI, 2016)



ภาพที่ 1 แนวเส้นประสีฟ้าแสดงพื้นที่การแพร่ระบาดของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
ที่มา: Vargas *et al*. (2015)

1.3 ชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

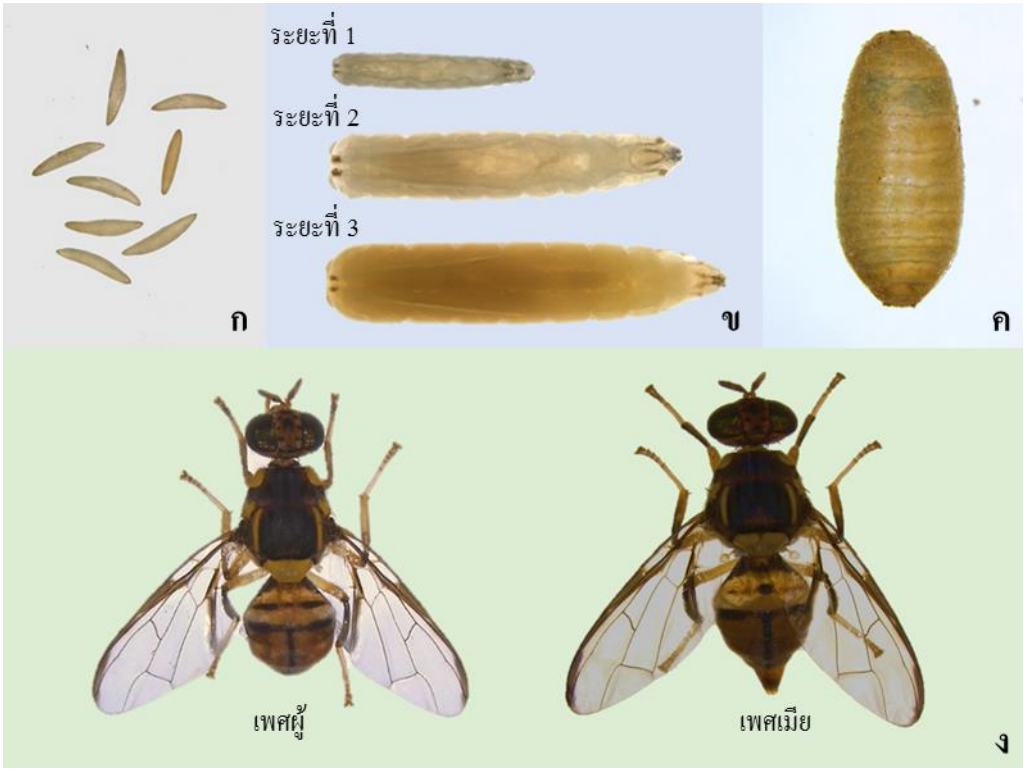
แมลงวันผลไม้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) โดยมีลำดับขั้นการพัฒนาการในระยะต่างๆรวม 4 ระยะ คือ ระยะไข่ (egg) ระยะหนอน (larva) ระยะดักแด้ (pupa) และระยะตัวเต็มวัย (adult) (ภาพที่ 2)

ระยะไข่: ตัวเต็มวัยเพศเมียใช้อวัยวะวางไข่ (ovipositor) เจาะใต้ผิวเปลือกผลไม้เพื่อวางไข่ ไข่ลักษณะเป็นฟองเดี่ยวๆลักษณะรียาว สีขาวขุ่นคล้ายเมล็ดข้าวสาร ฟักออกมาเป็นตัวหนอนภายใน 1–3 วัน ที่อุณหภูมิ 28–32 องศาเซลเซียส

ระยะหนอน: หนอนแบบ vermiform ตัวหนอนชอนไชกัดกินเนื้อภายในผลไม้ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผลไม้เสียหายมากที่สุด ส่งผลให้ผลไม้เน่าเสีย ร่วงหล่นลงพื้นหรือลักษณะรูปร่างไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค เป็นช่องทางให้เชื้อโรคพืชและแมลงศัตรูชนิดอื่นๆเข้าทำลายผลไม้ ระยะหนอนมี 3 วัย ใช้เวลา 8–12 วัน ในการเจริญเติบโตกัดกินอยู่ภายในผลไม้ หนอนในวัย 2 และ 3 จะอยู่ลึกลงไปในเนื้อผลไม้ หลังจากนั้นตัวหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้

ระยะดักแด้: ดักแด้แบบ coarctate ตัวหนอนวัย 3 ดีดตัวออกจากพืชอาหารลงสู่พื้นดิน เพื่อเข้าดักแด้ในดิน (หากมีอุณหภูมิลดต่ำลงการเข้าสู่ระยะดักแด้ของแมลงวันผลไม้จะยาวนานขึ้น) ระยะแรกดักแด้มีสีขาวขุ่นและค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ใช้ระยะเวลา 10–12 วัน และพัฒนาเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย

ระยะตัวเต็มวัย: เป็นแมลงวันขนาดปานกลาง หัวสีน้ำตาลอมเหลืองมีตารวมขนาดใหญ่ หนวดแบบ aristate มีขนยาวสีน้ำตาลเข้มหนึ่งเส้น บริเวณอก scutum สีดำ อกปล้องแรกไม่มีแถบ mesonotum มีแถบข้างอกทั้งสองสีเหลือง scutellum สีเหลือง ขาสีเหลืองอมน้ำตาล femur และ tibia สีน้ำตาล ปีกบางใสสะท้อนแสง costal cell ไม่มีสี ขอบปีกด้านบนมีสีน้ำตาลดำเข้ม ท้องปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 มีสีน้ำตาล ปล้องที่ 3 มีสีดำคาดตามขวาง และตรงกลางมีแถบคาดสีดำ ตัวเต็มวัยเพศผู้ขนาดเล็กกว่าเพศเมียเล็กน้อย ส่วนปลายท้องตัวเต็มวัยเพศเมียมีอวัยวะวางไข่ยื่นแหลม ตัวเต็มวัยมีอายุเฉลี่ย 1–3 เดือน สามารถวางไข่ได้ทุกวัน เฉลี่ยวันละ 50 ฟอง ตลอดอายุวางไข่ได้มากถึง 3,000 ฟอง สามารถพบตัวเต็มของแมลงวันผลไม้ตลอดทั้งปี ด้วยสาเหตุที่แมลงวันผลไม้มีพืชอาหารหลายชนิด จึงสามารถขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณประชากรจากพืชอาศัยชนิดต่างๆในแต่ละท้องถิ่นได้เกือบตลอดปี ทำให้มีประชากรแมลงวันผลไม้เกิดขึ้นใหม่ตลอดเวลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในฤดูร้อนซึ่งมีผลไม้ให้ผลผลิตเป็นจำนวนมาก เป็นช่วงที่แมลงวันผลไม้ระบาดรุนแรง เนื่องจากความอุดมสมบูรณ์ของอาหาร (Clarke *et al*., 2005)



ภาพที่ 2 ลักษณะแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)ในแต่ละระยะ
(ก) ระยะไข่ (ข) ระยะหนอน (ค) ระยะดักแด้ และ (ง) ระยะตัวเต็มวัย

1.4 การป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้

จากปัญหาการระบาดของแมลงวันผลไม้ ส่งผลให้ผลผลิตเกิดความเสียหายและมีคุณภาพต่ำ พบสารเคมีตกค้างในผลผลิตและสิ่งแวดล้อม ส่งผลต่อปัญหาด้านการส่งออกผลไม้ไปยังประเทศที่มีกฎหมายกักกันพืชอย่างเข้มงวดเช่น ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย (CABI, 2019) การป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้หลากหลายวิธี เช่น การใช้สารเคมี การรักษาความสะอาดแปลง เก็บผลไม้ร่วงและผลไม้ที่ถูกทำลายบนต้นไปเผาหรือกลบ การห่อผลด้วยวัสดุต่างๆป้องกันการวางไข่ของแมลงวันผลไม้ การฉายรังสีทำหมันแมลงวันผลไม้ (Sutantawong *et al*., 2002) การใช้เหยื่อล่อยีสต์โปรตีนดึงดูดแมลงวันผลไม้มากินเป็นอาหาร (Mau *et al*., 2006) การใช้สารเมทิลยูจีนอล (methyl eugenol) ซึ่งเป็นสารดึงดูดแมลงวันผลไม้เพศผู้ (Vargas *et al*., 2005) การใช้แมลงศัตรูธรรมชาติ (Vargas *et al*., 2012) การใช้สารสกัดพืช (Singh *et al*., 2003) การใช้เชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อราโรคแมลง (Mar and Lamyong, 2012) เป็นต้น

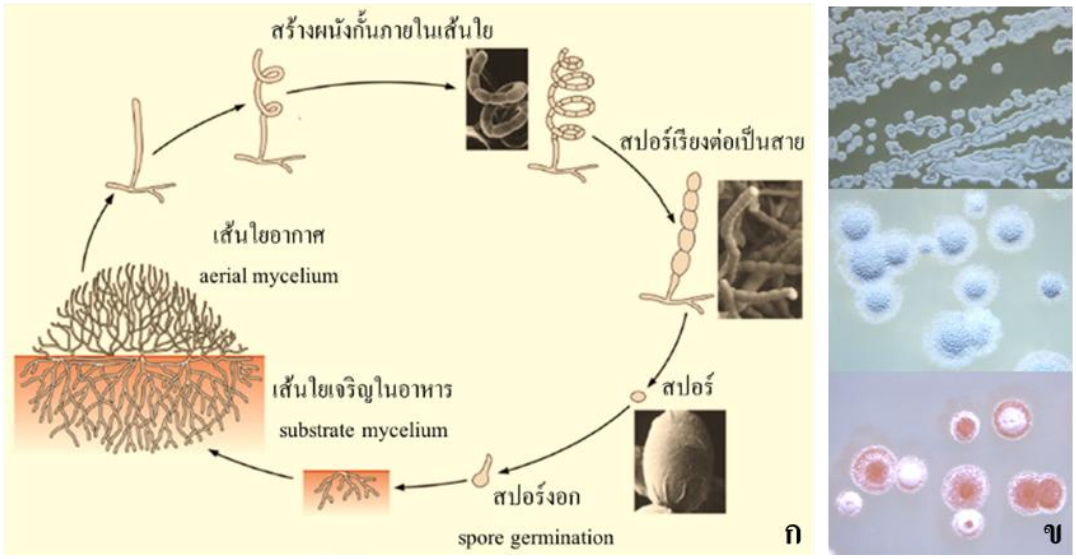
2. เชื้อ *Streptomyces* spp.

เชื้อ *Streptomyces* spp. จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ในกลุ่มแอคติโนมัยซีท (Actinomycetes) ต้องการออกซิเจนเพื่อใช้สำหรับการเจริญเติบโต (aerobic bacteria) มีการสร้างเส้นใย (mycelium) ที่แตกแขนงทำให้มีลักษณะคล้ายเชื้อรา พบได้บริเวณดินทั่วไป ดินตะกอน แหล่งน้ำจืด แหล่งน้ำทะเล ฝุ่นละอองในอากาศ บางชนิดดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายอินทรียวัตถุ (saprophyte) เอนโดไฟท์ในต้นพืช (endophyte) บางชนิดอาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยในสิ่งมีชีวิตอื่น (symbionts) เช่น ในกลุ่มฟองน้ำและในแมลง (Coombs and Franco, 2003) โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. จัดอยู่ในลำดับขั้นอนุกรมวิธานดังนี้

อาณาจักร: Bacteria
ไฟลัม: Actinobacteria
ชั้น: Actinobacteria
อันดับ: Actinomycetales
วงศ์: Streptomycetaceae
สกุล: *Streptomyces*

ในปัจจุบันเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* มีจำนวนมากกว่า 550 ชนิด (Kampfer *et al*., 2012) โดยเชื้อในกลุ่มนี้มีการเจริญโดยสปอร์หรือส่วนของเส้นใยที่หัก สร้างเส้นใยเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ (substrate mycelium) จากนั้นพัฒนาเส้นใยชูขึ้นในอากาศ (aerial mycelium) บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างผนังกั้นภายในเส้นใยแบ่งเป็นหลายเซลล์ จากนั้นพัฒนาไปเป็นสปอร์และเรียงต่อกันเป็นสาย ทำให้มีลักษณะคล้ายเชื้อราแต่มีขนาดเล็กกว่า โดยมีขนาดประมาณ 0.5–1.5 ไมโครเมตร เจริญได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 25–30 องศาเซลเซียส ระดับค่า pH 6.5–8.0 ใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงาน เชื้อในสกุล *Streptomyces* จัดจำแนกให้อยู่ในกลุ่มแบคทีเรีย ด้วยลักษณะเป็นเซลล์แบบโปรคาริโอต (prokaryote) ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส องค์ประกอบผนังเซลล์มีแปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ไม่มีเซลลูโลส (cellulose) กลูแคน (glucan) และไคติน (chitin) (Lechevalier and Lechevalier, 1970) ซึ่งแตกต่างจากผนังเซลล์ของเชื้อรา สปอร์เชื้อ *Streptomyces* spp.มีกลิ่นเฉพาะคล้ายกับกลิ่นของดิน (earthy odor) ที่เกิดจากสารจีออสมิน (geosmin, Trans–1, 10–dimethyl decalol) ซึ่งมักจะได้กลิ่นหลังจากฝนตกเนื่องจากสปอร์เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ที่อาศัยอยู่ในดิน (Izaguirre and Taylor, 2004)

การจัดจำแนกลักษณะและชนิดของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในเบื้องต้นสามารถตรวจดูได้จากความแตกต่างกันของก้านชูสปอร์ (sporophore) ที่มีลักษณะหลากหลายและสปอร์ (conidium) ที่มีสีสันแตกต่างกัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ aerial mycelium จะสร้างสปอร์แบบไม่เคลื่อนที่เรียงต่อกันเป็นสายสปอร์รูปแบบต่างๆ ได้แก่ แบบเส้นตรง (rectiflexibile) แบบวนเกลียว (spiral) แบบลูป (retinaculiaperti) ลักษณะของผิวสปอร์มี 5 แบบ คือ ผิวเรียบ (smooth) ผิวเป็นหนาม (spiny) ผิวเป็นปุ่ม (warty) ผิวเป็นขน (hairy) และผิวย่น (rugose) (Tresner *et al*., 1961) เมื่อเชื้อเจริญไประยะหนึ่ง aerial mycelium พัฒนาเป็นสปอร์ ผิวโคโลนีจะเปลี่ยนเป็นลักษณะคล้ายกำมะหยี (velvet) หรือคล้ายแป้ง (powdery) หลากหลายสีสัน เช่น สีเทา สีขาว สีเขียว สีฟ้า สีน้ำเงิน สีชมพู สีเทา หรือสีม่วง ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ *Streptomyces* spp. (ภาพที่ 3) เมื่อมีอายุมากผิวโคโลนีจะมีลักษณะย่น และบริเวณด้านล่างโคโลนี ที่เชื้อมีการเจริญจะเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีน้ำตาลเนื่องจากการสร้างรงควัตถุเมลานิน (Taddei *et al*., 2006)



ภาพที่ 3 การเจริญของเชื้อ *Streptomyces* spp.ที่มา: ดัดแปลงจาก Ait Barka *et al*. (2016)

(ก) วงจรการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* spp.

(ข) ลักษณะโคโลนีและสปอร์สีต่างๆของเชื้อ *Streptomyces* spp.

2.1 ความสำคัญของเชื้อ *Streptomyces* spp.

เชื้อ *Streptomyces* spp. ถูกค้นพบคุณสมบัติและใช้ประโยชน์มาตั้งแต่อดีต โดยเฉพาะคุณสมบัติการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) และสารทุติยภูมิที่หลากหลาย (Ditter *et al*., 2003) เชื้อในสกุล *Streptomyces* มีการผลิตสารปฏิชีวนะได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากเชื้อในอันดับ Actinomycetales (McCarthy and Williams, 1990) ได้รับการพัฒนาและนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายทางด้านการแพทย์ในการผลิตยาปฏิชีวนะ โดยมียาปฏิชีวนะมากกว่า 60 ชนิด ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* spp. และประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมทางการแพทย์ เช่น amphoteracin B, erythromycin, chloramphenicol, chlorotetracyclin, neomycin, nystatin, streptomycin, tetracycline, และ clindamycin เป็นต้น (Madigan *et al.,* 2009) อีกทั้งคุณสมบัติในการสร้างเอมไซม์ (enzyme) การสร้างสารต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) สารต่อต้านเชื้อรา (antifungal) สารปฏิชีวนะ (antibiotic) สารต้านปรสิต (antiparasitic) สารต้านไวรัส (antiviral) สารพิษ (toxin) สารกำจัดศัตรูพืช (pesticide) สารฆ่าแมลง (insecticide) สารกำจัดวัชพืช (herbicide) สารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant) สารต่อต้านเร็ง (anticancer) และสารต้านอนุมูลอิสระ (immunomodulating) รงควัตถุ (pigment) เป็นต้น

จากรายงานการศึกษามีการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ซึ่งเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถผลิตได้หลายชนิด ได้แก่ xylanase, cellulase, amylase และ chitinase เป็นต้น การศึกษาเอนไซม์ chitinase ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของราหรือเป็นองค์ประกอบของ exoskeleton ของพวก arthropod (Dahiya, 2006) จากการศึกษาของ Takashima และ Sakai (1960) พบว่าสาร teleocidin ที่ผลิตโดยเชื้อ *Streptomyces* ซึ่งอาศัยอยู่ในน้ำทะเล สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษกับปลา Swan และคณะ (1994) รายงานการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น penicillin–N ampicillin ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และพบว่าเชื้อ *S. antibioticus* สามารถสร้างสาร olidomycin ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนี้ยังมีการรายงานการค้นพบคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อราโดยสร้างสาร candicidin ที่ผลิตโดยเชื้อ *S. griseus* มีฤทธิ์ทำลายโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อรา สาร nastatin ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อราหลายชนิด จากการศึกษาของ Tsuji และคณะ (1975) พบว่าเชื้อ *S. hygroscopicus* สามารถสร้าง trichostatin ยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* ภายในห้องทดลองได้ ปรารถนา และคณะ (2557) ทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. philanthi* สายพันธุ์ RL–1–178 ในห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราที่เป็นสาเหตุโรคราสนิม โรคราแป้ง และโรคใบจุดบนใบถั่วฝักยาวได้ สำหรับการ

ทดสอบในแปลงปลูกพบว่า *S. philanthi* สามารถลดระดับการเกิดโรคทั้ง 3 ชนิดได้ Kaur และ Manhas (2013) พบว่าเชื้อ *S. hydrogenans* DH16 มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Alternaria brassicicola, A. mali, A. alternata, Cladosporium herbarum, Colletotrichum acutatum*, *C. gleospoiroides, Cercospora* sp., *Exserohilum* sp., *Fusarium oxysporum* และ *F. moniliformae* ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพการเป็นเชื้อจุลินทรีปฏิปักษ์ที่ดีในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช Castillo และคณะ (2006) รายงานว่า *S. albidoflavus* มีความสามารถในการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชไดยูรอน (Diuron) ได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้การทดสอบในห้องปฏิบัติการ และบางชนิดมีความสามารถในการย่อยสารอะลาคลอร์ (alachlor) ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชควบคุมวัชพืชก่อนงอกที่มีพิษรุนแรง (Sette *et al*., 2005) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสารที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง (insecticide) ซึ่งจะกล่าวต่อไป

2.2 คุณสมบัติของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการฆ่าแมลง

แมลงมีผนังลำตัวหรือโครงสร้างภายนอก (exoskeleton) ซึ่งประกอบไปด้วยสารพวกไคติน (chitin) ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้อวัยวะภายในและทำหน้าที่ยึดเกาะกับกล้ามเนื้อต่างๆ เพื่อให้สามารถเคลื่อนไหวได้ แมลงทุกชนิดมีการลอกคราบ เพื่อการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (metamorphosis) อย่างสมบูรณ์ Muller และคณะ (1981) รายงานว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. มีการสร้างสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลง โดยเชื้อ *S. tendae* สามารถสร้างสาร macrolide ยับยั้งการลอกคราบของแมลง และสร้างสาร nikkomycin Z ซึ่งส่งผลต่อการสังเคราะห์ไคตินของแมลงส่งผลต่อพัฒนาการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง (Arakawa and Sugiyama, 2002) อีกทั้งเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถสร้างสารที่เป็นสารฆ่าแมลงอีกหลายชนิด เช่น ยาต้านปรสิต milbemycin (Takiguchi *et al*. 1980) การค้นพบสารปฏิชีวนะที่เชื้อ *Streptomyces* spp. สร้างขึ้น ได้แก่ สาร flavensomycin (Craveri and Giolitti, 1957) สาร antimycin (Kido and Spyhalski, 1950) สาร piericidins (Takahaski *et al*., 1968) สาร macrotetralides (Oishi *et al*.,1970) และสาร prasinons (Box *et al*., 1973) ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารฆ่าแมลงและสารฆ่าไร อีกทั้งแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการสร้างสารต่อต้านปรสิต ได้แก่ สาร tetranactin (Ando *et al*., 1971) สาร avermectin (Burg *et al*., 1979) สาร valinomycin (Heisey *et al*., 1988) สาร pyrrolizine derivatives (Jizba *et al*., 1992) สาร respirantin (Urushibata *et al*., 1993) สาร griseulin (Nair *et al*., 1993) และสาร martinomycin (Carter *et al*., 1994) การศึกษาของ Turner และ Schaeffer (1989) ค้นพบสาร avermectin ที่สร้างโดยเชื้อ *S. avermitilis* มีความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงและขับพยาธิ (anthelmintic activity) Ouyang และ

คณะ (1996) รายงานการสร้างสาร meilingmycin จากเชื้อ *S. nanchangesis* ออกฤทธิ์ฆ่าแมลงในกลุ่มผีเสื้อ เพลี้ย ไรศัตรูพืช และไส้เดือนฝอยศัตรูพืช (Sun *et al*., 2002) การศึกษาเชื้อ *Streptomyces* sp. CP1130 ของ Lewer และคณะ (2003) พบการผลิตสาร tartrolone C มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง นอกจากนี้ยังมีการรายงานเพิ่มเติมเกี่ยวกับเชื้อ *S. hygroscopicus* ที่สามารถผลิตสาร emametrin และ milbemetin ซึ่งเป็นพิษกับแมลงในกลุ่ม Lepidoptera จากการศึกษาของ Wang และคณะ (2011) รายงานการค้นพบสาร milbemectin และ doramectin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ lactone สร้างโดย *S. avermitilis* มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงและไรศัตรูพืช Shia และคณะ (2013) รายงานการแสดงความเป็นพิษของเชื้อ *S. albus* ซึ่งปกติดำรงชีวิตเป็นเชื้อเอนโดรไฟท์ในหญ้า แสดงความเป็นพิษรุนแรงกับเพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* จากการศึกษาของ Vijayabhrathi และคณะ (2014) พบเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 16 ไอโซเลท มีคุณสมบัติการเป็นเชื้อก่อโรคในแมลง (pathogenicity) ส่งผลให้มีการตายในหนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* และหนอนเจาะลำต้นข้าวโพด *Chilo partellus* Sathya และคณะ (2016) รายงานการผลิตสาร diketopiperazine, cyclo (Trp–Phe) จากเชื้อ *S. griseoplanus* SAI–125 ออกฤทธิ์ฆ่าหนอนเจาะสมอฝ้าย *H. armigera* จากคุณสมบัติของ *Streptomyces* spp. ซึ่งสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติการเป็นสารฆ่าแมลง นำมาซึ่งแนวคิดในการประยุกต์ใช้เชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ท้องถิ่นมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

3. การประยุกต์ใช้เชื้อ *Streptomyces* spp. ควบคุมแมลง

Shi (2000) ได้ทำการตรวจสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทุติยภูมิจากจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีท 41 ไอโซเลท ในหนอนกระทู้ผัก *S. littoralis* พบ 23 ไอโซเลท ที่มีความรุนแรงทำให้หนอนตาย 10–60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสกุล *Streptomyces* และ *Streptoverticillium* สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสรีรวิทยาของแมลง มีศักยภาพในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยาฆ่าแมลง Arasu และคณะ (2013) พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. AP–123 มีคุณสมบัติยับยั้งการกิน (antifeedant) การฆ่าตัวหนอน (larvicidal insecticide) และยับยั้งการเจริญเติบโตในหนอน *H. armigera* และหนอนกระทู้ *S. litura* ซึ่งจากการทดสอบพบว่ามีคุณสมบัติยับยั้งการกินของหนอน *H. armigera* 78.51 เปอร์เซ็นต์ และ *S. litura* 70.75 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm คุณสมบัติการฆ่าตัวหนอน *H. armigera* 63.11 เปอร์เซ็นต์ และ *S. litura* 58.22 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงค่าระดับความเป็นพิษ LC_{50} (lethal concentration) ใน *H. armigera* 645.25 ppm และ *S. litura* 806.54 ppm ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแมลงทั้งในระยะดักแด้และตัวอ่อน

Kaur และคณะ (2014) รายงานการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็น lavicidal insecticide โดยเชื้อ *S. hydregenans* DH16 สามารถยับยั้งการเจริญและพัฒนาการของหนอนกระทู้ Samri และคณะ (2015) พบว่าแอคติโนมัยซีทมีคุณสมบัติในการฆ่าหนอนแมลงวันผลไม้ Mediterranean fruit fly (*Ceratitis cappitata*) และให้ผลดีในวัยที่หนึ่งของหนอนแมลงวันผลไม้ *C. cappitata* Huamei และคณะ (2008) รายงานว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. สร้างสารทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ *S. exigua* หนอนผีเสื้อ *Dendrolimus punctatus* หนอนใยผัก *Plutella xylostella* เพลี้ยอ่อนถั่วเหลือง *Aphis glycines* และยุง *Culex pipiens* Pitterna และคณะ (2009) รายงานการสร้างสาร avermectins ซึ่งมีโครงสร้างวงแหวน 16–membered macrocyclic lactone จากเชื้อ *S. avermitilis* ออกฤทธิ์บริเวณกระเพาะอาหารของแมลง เมื่อแมลงได้รับเชื้อโดยการกินและเกิดการหมักในกระเพาะอาหารภายใน 24 ชั่วโมง สารดังกล่าวทำให้แมลงในอันดับ Lepidoptera และ Diptera แสดงอาการอัมพาตและตายในที่สุด Gadelhak และคณะ (2005) รายงานการค้นพบเชื้อ *S. clavuligerus* ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนส ยับยั้งการสร้างไคติน ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในระยะดักแด้ของแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* El–Bendary และคณะ (2010) รายงานการเป็นสาร larvicidal insecticide ของเชื้อ *S. microflavus* ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง *C. pipiens* Janaki (2016) รายงานสาร larvicidal insecticide ของเชื้อ *S. cacaoi* subsp. *cacaoi* M20 ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำวัยที่ 3 ของยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* อัตราการตายสูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ Sakr (2007) ทดสอบประสิทธิภาพน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. lavendulae* ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับหนอนกระทู้ผัก *S. littoralis* วัยที่ 3 พบว่าส่งผลต่อการเข้าดักแด้ของหนอนกระทู้ผัก ทำให้การเข้าดักแด้ช้าลงและบางส่วนสามารถเข้าสู่ระยะดักแด้ได้แต่ตัวเต็มวัยที่ออกมาจากดักแด้มีลักษณะที่ผิดปกติ เมื่อตรวจสอบภายในซากตัวหนอนที่ตายพบว่าถูกทำลายเนื่องจากเชื้อ *S. lavendulae* ที่บริเวณระบบทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid–gut)

จากข้อมูลความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการเข้าทำลายแมลง พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. มีหลายสายพันธุ์ที่สามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้ในการควบคุมแมลงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ท้องถิ่นที่สามารถปรับตัวในพื้นที่ได้เป็นอย่างดี และอาจมีศักยภาพในการเข้าทำลายแมลง สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดที่มีฤทธิ์ควบคุมแมลงศัตรูพืช งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการนำเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ท้องถิ่นมาใช้ควบคุมแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ซึ่งเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญของประเทศไทย เพื่อเป็นแนวทางในการนำเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ท้องถิ่นมาใช้ในการควบคุมแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หรือแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นๆ และเป็นแนวทางสำหรับลดการใช้สารเคมีควบคุมแมลง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกและจำแนกชนิดเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการเข้าทำลายแมลง
2. เพื่อศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการเข้าทำลายแมลง
3. เพื่อศึกษาชนิดของสารทุติยภูมิของเชื้อ *Streptomyces* spp.
4. การนำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพมาใช้ในการควบคุมแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis*

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

ทำการคัดกรองเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง และนำมาทดสอบการควบคุมแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* โดยทำการศึกษาตามขั้นตอนภายในห้องปฏิบัติการของภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1. การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

1.1 การเก็บแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จากธรรมชาติ

เก็บรวบรวมผลฝรั่งและมะละกอที่มีร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้จากแปลงภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และจากแปลงปลูกเกษตรกร ต.หาดใหญ่ อ.หาดใหญ่ จ. สงขลา (ภาพที่ 4) เลี้ยงในกล่องพลาสติกใส ขนาด 16.5×23.5×9.5 เซนติเมตร ที่บริเวณฝามีการเจาะรูสำหรับระบายอากาศและเลี้ยงหนอนแมลงวันผลไม้ด้วยอาหารเทียมตามสูตรของ Swaine และคณะ (1978) (อ้างโดย แสน, 2529) (ตารางที่ 1) เมื่อตัวหนอนเจริญเข้าสู่ระยะที่ 3 ย้ายมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกใสขนาด 16.5×23.5×9.5 เซนติเมตร ที่รองพื้นด้วย vermiculite สูงประมาณ 2 เซนติเมตร สำหรับให้หนอนดีดตัวเพื่อเข้าดักแด้ เมื่อตัวเต็มวัยออกจากดักแด้นำไปเลี้ยงในกรงผ้ามุ้งเลี้ยงแมลงขนาด 30×30×30 เซนติเมตร คัดแยกเฉพาะตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ภายในกรงจัดยีสต์ น้ำตาลก้อน และน้ำเป็นแหล่งอาหารสำหรับแมลง เลี้ยงจนกว่าตัวเต็มวัยได้รับการผสมพันธุ์และพร้อมวางไข่

ภาพที่ 4 ผลไม้ในแปลงปลูกที่มีการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

1.2 การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในห้องปฏิบัติการ

เมื่อตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่เก็บจากธรรมชาติได้รับการผสมพันธุ์และพร้อมวางไข่ นำผลฝรั่งที่ผ่านการเจาะรูที่ผิวภายนอกผล ด้วยเข็มเขี่ยเชื้อจำนวน 50 รู มาวางในกรงเป็นระยะเวลา 1 วัน สำหรับให้ตัวเต็มวัยเพศเมียแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เข้ามาวางไข่ จากนั้นนำผลฝรั่งไปบ่มในกล่องพลาสติกใสขนาด 16.5×23.5×9.5 เซนติเมตร ที่บริเวณฝามีการเจาะรูสำหรับระบายอากาศ รอจนหนอนฟักออกจากไข่และพัฒนาอยู่ภายในผลฝรั่ง เลี้ยงแมลงวันผลไม้ในระยะหนอน ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัย ตามข้อ 1.1 เพื่อเตรียมแมลงวันผลไม้ในแต่ละระยะสำหรับการทดลองต่อไป

1.3 การเตรียมอาหารเทียม

ชั่งส่วนผสมอาหารดังตารางที่ 1 จากนั้นนำกระดาษชำระมาฉีกให้เป็นขนาดเล็กและแช่น้ำให้เปียกชุ่ม กล้วยและข้าวโพดหวานดิบปอกเปลือกและหั่นเป็นชิ้นเล็ก เพื่อความสะดวกในการปั่นให้เป็นเนื้อละเอียด ปั่นส่วนผสมทั้งหมดด้วยเครื่องปั่นอเนกประสงค์ให้ละเอียด แล้วเทลงกล่องที่มีฝาปิดมิดชิดเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4–10 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองระยะสั้น หรือเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาไว้ในระยะยาว

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
เมล็ดข้าวโพดหวานดิบ	150 กรัม
กล้วยน้ำว้าสุก	150 กรัม
กระดาษชำระชนิดหยาบ	30 กรัม
น้ำตาลทรายขาว	30 กรัม
Brewer’s yeast	30 กรัม
Sodium benzoate	0.6 กรัม
Hydrochloric acid	1.2 มิลลิลิตร
น้ำ	300 มิลลิลิตร

ที่มา : (Swaine *et al*., 1978 อ้างโดย แสน, 2529)

2. การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp. เพื่อทดสอบ

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. สำหรับใช้ในการทดสอบ ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.ชนินันท์ พรสุริยา ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 37 ไอโซเลท ซึ่งแยกมาจากดินรอบรากต้นมะขามป้อมบริเวณอ่างเก็บน้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา และจาก ดร.ภรณี ศรีปรีชาศักดิ์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จำนวน 15 ไอโซเลท ซึ่งแยกมาจากดินบริเวณเกาะสมุย จ.สุราษฎร์ธานี รวมทั้งหมดจำนวน 52 ไอโซเลท มาทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ (streak plate technique) และเลี้ยงเพิ่มปริมาณ โดยการขีดเชื้อ *Streptomyces* spp. ด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ (inoculation loop) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract malt extract agar (GYMA) (ตารางที่ 2) และบ่มไว้ที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดจนกว่าเชื้อสร้างสปอร์ เพื่อเตรียมสำหรับการทดลอง

สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในอาหารเหลวเพื่อเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA บ่มจนเชื้อสร้างสปอร์และตัดโคโลนีด้วย cock borer ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 มิลลิเมตร จากนั้นย้ายเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract malt extract broth (GYMB) (ตารางที่ 3) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (shaker) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที จนเชื้อเจริญเต็มที่เป็นระยะเวลา 10–15 วัน แล้วแต่ชนิดของเชื้อ *Streptomyces* spp. เพื่อเตรียมสำหรับการทดลอง

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract malt extract agar (GYMA)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
glucose	4 กรัม
yeast extract	4 กรัม
malt extract	10 กรัม
วุ้น	14 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายส่วนประกอบและนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract malt extract broth (GYMB)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
glucose	4 กรัม
yeast extract	4 กรัม
malt extract	10 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายส่วนประกอบและนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3. การคัดกรองเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay (Sujitwanit *et al*., 2007)

3.1 การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp.

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.ชนินันท์ พรสุริยา จำนวน 37 ไอโซเลท และจาก ดร.ภรณี ศรีปรีชาศักดิ์ จำนวน 15 ไอโซเลท รวมทั้งหมดจำนวน 52 ไอโซเลท มาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติในการฆ่าแมลง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ทรีตเมนต์ประกอบด้วย ส่วนใสจากเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 52 ไอโซเลท และมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม จำนวน 3 ซ้ำ เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA แล้วนำไปบ่มไว้ที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด เป็นเวลา 10 วัน หรือจนกว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. สร้างสปอร์ นำสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 1 ลูป ใส่ลงไปในหลอดไมโครเซนต์ติฟิวก์ (micro centrifuge tube) ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร ภายในหลอดเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าหลอดไมโครเซนต์ติฟิวก์ด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) เป็นเวลา 60 วินาที นำหลอดไมโครเซนต์ติฟิวก์ที่มีสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อ *Streptomyces* spp. ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวนรอบ 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 นาที ดูดแยกส่วนใสเหนือตะกอน (supernatant) ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ใส่หลอดไมโครเซนต์ติฟิวก์ที่ปลอดเชื้อหลอดใหม่ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมทดสอบ

3.2 การเตรียมอาร์ทีเมีย หรือไรทะเล (brine shrimp)

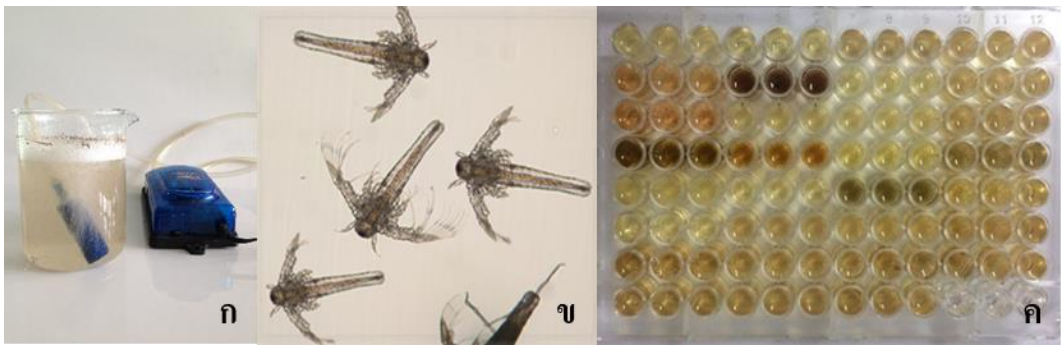
อาร์ทีเมีย *Artemia salina* เป็นสิ่งมีชีวิตที่นิยมใช้เป็นตัวทดสอบทางชีววิธี (bioassay) เพื่อศึกษาความเป็นพิษของนิเวศวิทยาแหล่งน้ำ (aquatic ecology) หรือใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารพิษหรือสารสกัดต่างๆ (toxicity test) เป็นต้น การเพาะฟักโดยนำไข่อาร์ทีเมียมาแช่ในน้ำทะเล สัดส่วนไข่อาร์ทีเมีย 10 กรัม ต่อน้ำทะเลปริมาตร 500 มิลลิลิตร ให้อากาศโดยใช้เครื่องปั๊มออกซิเจนขนาดกำลังไฟ 5 วัตต์ ต่อสายปั๊มลมกับหัวทรายเพื่อให้อากาศตลอดระยะเวลาการเพาะฟักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนไข่ฟักเป็นตัวอ่อนระยะ nauplii จากนั้นหยุดให้ออกซิเจน แยกส่วนของเปลือกไข่ออกจากตัวอ่อนอาร์ทีเมีย เพื่อเตรียมทดสอบ

3.3 การทดสอบคุณสมบัติการฆ่าอาร์ทีเมียของเชื้อ *Streptomyces* spp.

ดูดตัวอ่อนอาร์ทีเมียที่ได้จากการเพาะฟักปริมาตร 200 ไมโครลิตร (มีอาร์ทีเมียประมาณ 9–15 ตัว) หยอดลงในจาน 96 หลุม (96 well tissue culture plate) จากนั้นเติมส่วนใสของเชื้อ *Streptomyces* spp. ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม (ภาพที่ 5) ตรวจนับและบันทึกการตายของอาร์ทีเมียที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การตายด้วยสมการ (Sujitwanit *et al*., 2007)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตาย} = \frac{\text{จำนวนอาร์ทีเมียที่ตาย หรือไม่เคลื่อนที่}}{\text{จำนวนอาร์ทีเมียทั้งหมด}} \times 100$$

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (One–Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์โดยวิธี Tukey's HSD test ด้วยโปรแกรม SPSS version 11 for windows (SPSS, 2001)



ภาพที่ 5 การทดสอบคุณสมบัติการฆ่าแมลงของเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยเทคนิค brine shrimp bioassay

(ก) การเพาะเลี้ยงอาร์ทีเมีย

(ข) ลักษณะตัวอ่อนอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

(ค) ทดสอบคุณสมบัติการฆ่าแมลง โดยเทคนิค brine shrimp bioassay ในจาน 96 หลุม

4. การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการฆ่าแมลง

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลงจำนวน 10 ไอโซเลท (คัดเลือกมาจากการทดลองตามข้อ 3) ได้แก่ K4H–9, K4H–10, K5H–10, K5–4, K6–5, K8–4, K8–10, NRST9, NRST15 และ NRST17 มาทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทรีทเมนต์ประกอบด้วยเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพจำนวน 10 ไอโซเลท และมีอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA เป็นชุดควบคุม จำนวน 3 ซ้ำ โดยแบ่งการทดลองย่อยดังนี้

4.1 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (chitinase)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA + colloidal chitin 1% และเติมสาร bromocresol purple 0.015% (Agrawal and Kotasthane, 2009) เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคติเนส นำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เลี้ยงในจานอาหาร GYMA อายุ 10 วัน เจาะโคโลนีเชื้อด้วย cock borer ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 มิลลิเมตร ย้ายลงตรงจุดกึ่งกลางของจานอาหารสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคติเนส โดยเตรียมภายในตู้ปลอดเชื้อ นำจานอาหารไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด สำหรับการวัดการสร้างเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อ *Streptomyces* spp. หากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสเพื่อย่อยไคตินได้จะเปลี่ยนสี

อาหารเป็นสีม่วงรอบโคโลนี (Agrawal and Kotasthane, 2009) สังเกตและบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและวงสีม่วงรอบโคโลนี บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการบ่มเชื้อที่ 3, 5 และ 7 วัน

4.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (protease)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA + skim milk 3% เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส เตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เลี้ยงบนจานอาหาร GYMA อายุ 10 วัน เจาะด้วย cock borer ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 มิลลิเมตร ย้ายลงตรงจุดกึ่งกลางของจานอาหารสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส โดยเตรียมภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ นำจานอาหารไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด สำหรับการวัดการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถสังเกตวงใสจากการย่อยของ skim milk บนจานอาหาร (ดัดแปลงจาก Thaochan and Chadrapatya, 2016) สังเกตและบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและวงใสรอบโคโลนีที่อายุ 3, 5 และ 7 วัน นำค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและโคโลนีมาคำนวณหาค่าดัชนีเอนไซม์ (enzymatic index) ตามสมการ (Florencio *et al*., 2012)

$$\text{ค่า enzymatic index} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}}$$

นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (One–Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์โดยวิธี Tukey's HSD test ด้วยโปรแกรม SPSS version 11 for windows (SPSS, 2001)

5. การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลง โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay

5.1 การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp.

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลงทั้ง 9 ไอโซเลท ได้แก่ K4H–9, K4H–10, K5H–10, K5–4, K8–4, K8–10, NRST9, NRST15 และ NRST17 (ไอโซเลท K6–5 ตรวจพบอยู่ในกลุ่มก่อโรคในมนุษย์จึงไม่นำมาทดสอบต่อ) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในจานอาหาร GYMA อายุ 10 วัน เจาะด้วย cock borer ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 มิลลิเมตร จำนวน 3 ชิ้น ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว GYMB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง Shaker จำนวนรอบ 150 รอบต่อนาที ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, และ 4 สัปดาห์ เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. กรองแยกส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากเส้นใยและสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ด้วยชุดกรองสุญญากาศ (vacuum microfiltration assembly) นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง จำนวนรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ4 องศาเซลเซียส ดูดน้ำเลี้ยงเชื้อเหนือตะกอนและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมทดสอบคุณสมบัติการฆ่าแมลงโดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay

5.2 การทดสอบคุณสมบัติการฆ่าแมลงโดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay

การเตรียมตัวอ่อนอาร์ทีเมียเตรียมเช่นเดียวกับข้อที่ 3.2 ดูดตัวอ่อนอาร์ทีเมียปริมาตร 200 ไมโครลิตร (มีอาร์ทีเมียประมาณ 9–15 ตัว) หยอดลงในจาน 96 หลุม จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทรีทเมนต์ประกอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพจำนวน 9 ไอโซเลท ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ และมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ทำจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นตรวจนับและบันทึกการตายของอาร์ทีเมียที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การตาย วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (One–Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์โดยวิธี Tukey's HSD test ด้วยโปรแกรม SPSS version 11 for windows (SPSS, 2001)

6. การคัดกรองน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ส่งผลต่อการเจริญของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะหนอน (ทดสอบเบื้องต้น)

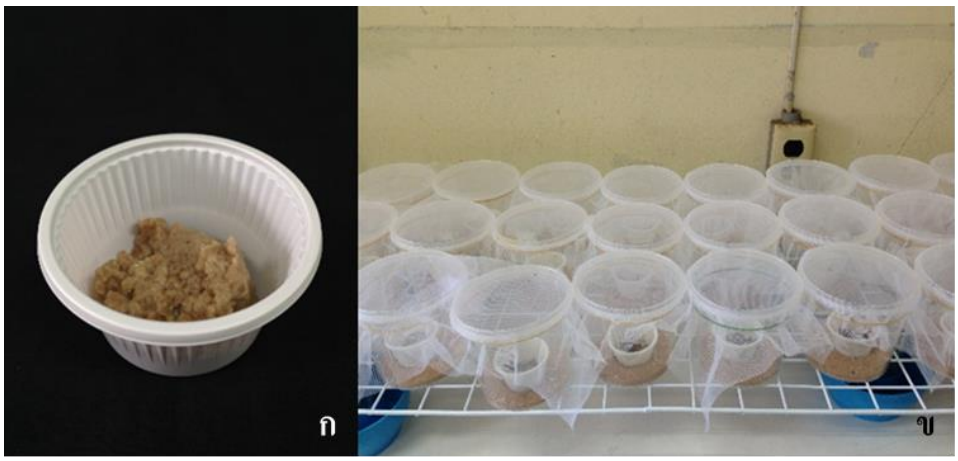
6.1 การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp.

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลงทั้ง 9 ไอโซเลท ได้แก่ K4H–9, K4H–10, K5H–10, K5–4, K8–4, K8–10, NRST9, NRST15 และ NRST17 เลี้ยงในจานอาหาร GYMA เป็นระยะเวลา 10 วันหรือจนกว่าเชื้อสร้างสปอร์ เจาะด้วย cock borer ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 มิลลิเมตร จำนวน 3 ชิ้น และย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว GYMB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่อง shaker จำนวนรอบ 150 รอบต่อนาที ตามระยะเวลาการเลี้ยงที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลงของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในแต่ละไอโซเลท จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ได้กรองแยกส่วนเส้นใยและสปอร์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ด้วยชุดกรองสุญญากาศ นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงจำนวนรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดแยกน้ำเลี้ยงเชื้อเหนือตะกอนและเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่ได้เตรียมทดสอบ

6.2 การทดสอบในหนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis*

นำตัวหนอนระยะที่ 2 ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* มาใช้สำหรับทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ส่งผลต่อแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทรีตเมนต์ประกอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ ปราศจากเซลล์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 9 ไอโซเลท และมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ทำจำนวน 3 ซ้ำ จำนวนแมลงวันผลไม้ซ้ำละ 20 ตัว เติมน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ เชื้อ *Streptomyces* spp. ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ส่วนชุดควบคุมเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในปริมาตรที่เท่ากัน ผสมในอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงหนอนแมลงวันผลไม้ปริมาตร 30 กรัม ในจานอาหารขนาด 5 x 2.5 x 3.5 เซนติเมตร ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. แต่ละไอโซเลทกับอาหารเทียมให้เข้ากันและปล่อยให้หนอนแมลงวันผลไม้กิน ทดสอบในกล่องพลาสติกทรงกลมขนาด 11.8 x 8.5 x 8.7 เซนติเมตร ภายในกล่องรองพื้นด้วยขี้เลื่อยละเอียดที่ผ่านการฆ่าเชื้อสูงประมาณ 2 เซนติเมตร สำหรับให้ระยะหนอนดีดตัวเพื่อเข้าดักแด้ บริเวณฝากล่องปิดด้วยผ้ามุ้งเพื่อระบายอากาศ ปล่อยให้ตัวหนอนกินอาหารและเจริญที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 6) บันทึกจำนวน ตัวหนอนที่ตาย ตัวหนอนที่สามารถเข้าระยะดักแด้ จำนวนตัวเต็มวัย ระยะการเจริญจากตัวหนอน–ดักแด้ และดักแด้–ตัวเต็มวัย

ลักษณะความผิดปกติของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในแต่ละระยะ คำนวณเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (One–Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์โดยวิธี Tukey's HSD test ด้วยโปรแกรม SPSS version 11 for windows (SPSS, 2001)



ภาพที่ 6 การคัดกรองเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 9 ไอโซเลท ต่อการเจริญของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะหนอน (ทดสอบเบื้องต้น)
(ก) อาหารเทียมที่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp.
(ข) กล่องทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อการเจริญของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis*

7. การศึกษาสัณฐานวิทยาและจำแนกชนิดเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพโดยวิธีทางอณูวิทยา

7.1 การศึกษาสัณฐานวิทยา

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. มีศักยภาพในการฆ่าหนอนแมลงผลไม้ *B. dorsalis* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ K8–10, NRST15 และ NRST17 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA แล้วนำไปบ่มไว้ที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดเป็นเวลา 15 วัน หรือจนเชื้อ *Streptomyces* spp. สร้างสปอร์ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามหนังสือ Bergey 's Manual โดยบันทึกลักษณะสีโคโลนีบนจานอาหาร และรูปร่างของสปอร์

ลักษณะสัณฐานวิทยา เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยการ streak เชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA เป็นเส้นตรง จากนั้นนำกระจกปิดสไลด์ (cover slid) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อฝังลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำมุมเอียงประมาณ 45 องศา บริเวณแนวเชื้อที่ streak แล้วนำไปบ่มไว้ที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดเป็นเวลา 7 วัน ทำการถอดกระจกปิดโดยใช้คีม (forcep)

คีบกระจกปิดสไลด์ออกจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หยด lactophenol cotton blue 1 หยด บนแผ่นสไลด์ (microscope slide) จากนั้นนำกระจกปิดสไลด์ที่มีการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* spp. ปิดทับบนหยด lactophenol cotton blue บนแผ่นสไลด์ นำไปตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 100 เท่า

การย้อมสีแบบแกรม (gram stain) เริ่มจากทำความสะอาดสไลด์ เช็ดให้แห้ง แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุ่มน้ำแตะลงบนสไลด์ 1–2 หยด จากนั้นเขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. มาเพียงเล็กน้อย แตะเชื้อลงบนหยดน้ำแล้วเกลี่ย (smear) บนสไลด์ ทิ้งให้แห้งและทำการตรึง (fixing of the smear) เพื่อทำให้เซลล์ติดแน่นกับสไลด์ โดยการนำสไลด์ลนผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2–3 ครั้ง หยด crystal violet ให้ท่วมรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที เทสีทิ้ง จากนั้นหยดสารละลาย logol's iodine ให้ท่วมรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีออกด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 วินาที ล้างน้ำสะอาด หยด safranin ให้ท่วมรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 30 วินาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วซับให้แห้ง จากนั้นตรวจดูลักษณะการติดสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 100 เท่า ถ้าเชื้อเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของ crystal violet และแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของ safranin

7.2 จำแนกชนิดเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยวิธีทางอณูวิทยา

7.2.1 การสกัดดีเอ็นเอเชื้อ *Streptomyces* spp.

การจำแนกชนิดโดยวิธีการทางอณูวิทยา นำส่วนของเส้นใยและสปอร์เชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลท K8–10, NRST15 และ NRST17 มาสกัด DNA ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) โดยเก็บเส้นใยและสปอร์เชื้อ *Streptomyces* spp. ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำเส้นใยมาใช้สกัดดีเอ็นเอ นำเส้นใยและสปอร์เชื้อ *Streptomyces* spp. เติมสารละลาย CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บดให้ละเอียดด้วยแท่ง micropestle เพื่อให้เซลล์แตก บ่มตัวอย่างด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิชนิดแห้ง (mini heating dry bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตกตะกอนโปรตีนโดยเติม CIA (chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไมโครเซนติฟิวก์ไปมาเบาๆ 15 นาที ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสด้านบน (supernatant) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์หลอดใหม่ เติม CIA ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไมโครเซนติฟิวก์ไปมาเบาๆ 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์หลอดใหม่ เติม freezer cold isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายในหลอดออก ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่อยู่ก้นหลอดด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งและตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water, DI) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ตรวจหาดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟเรซีส (gel electrophoresis)

7.2.2 เจลอิเล็กโตรโฟเรซีส (gel electrophoresis)

การเตรียมเจล ใช้อะกาโรส (agaros) ความเข้มข้น 1 % ละลายอะกาโรส 0.5 กรัม ใน 0.5X TBE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต้มในเครื่องไมโครเวฟให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทลงในถาดที่วางช่องหวี (well comb) หนาประมาณ 5 มิลลิเมตร เมื่อเจลแข็งตัวค่อยๆดึงหวี (comb) ย้ายถาดเจลไปใส่เครื่อง electrophoresis โดยเติม 0.5X TBE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล

การเตรียมตัวอย่าง โดยผสมดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับ loading dye (GenedireX, China) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบนแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) หยอด 1 kB DNA marker (GenedireX, China) 3 ไมโครลิตร ดูดสารละลายที่เตรียมไว้ หยอดลงในช่อง (well) ของเจล เปิดเครื่อง electrophoresis ปรับความต่างศักย์ไฟฟ้าให้ได้ 100 โวลต์ เมื่อครบ 20 นาที นำเจลมาตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator (GenedireX, Taiwan)

7.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง 16S rDNA โดยใช้ universal primer คู่ไพรเมอร์ forward primer 27F (5′ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3′) และ reverse primer 1492R (5′ GGTTACCTTGTTACGACTT 3′) (Lane, 1991) ส่วนผสมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) 25 ไมโครลิตร (Thermo Scientific, USA) DNA template 2 ไมโครลิตร forward primer 1 ไมโครลิตร reverse primer 1 ไมโครลิตร และ nuclease–free water 21 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำเข้าเครื่อง Thermal Cycler รุ่น T100™ (Bio–Rad, USA) ตั้งค่าโปรแกรมโดยมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยาดังนี้

initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	2 นาที	จำนวน 1 รอบ
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	10 นาที	จำนวน 1 รอบ

ตรวจสอบ PCR product โดยใช้เทคนิค gel electrophoresis ผสม PCR product ปริมาตร 3 ไมโครลิตรกับ loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หยอด 1 kB DNA marker 3 ไมโครลิตร แล้วตรวจสอบโดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1 % ปรับความต่างศักย์ไฟฟ้าให้ได้ 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที นำเจลมาตรวจสอบแถบ PCR product ด้วยเครื่อง UV transilluminator

7.2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

ส่งตัวอย่าง PCR product วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ นำข้อมูลลำดับเบสเทียบเคียงชนิดกับฐานข้อมูล GenBank (website http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ด้วยโปรแกรม BLAST

7.2.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank มาจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Clustal W version 2.1 (alignment) ปรับแต่งลำดับเบสในโปรแกรม BioEdit version 7.2.5 นำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA version 7

8. การศึกษาสารทุติยภูมิของเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่มีศักยภาพฆ่าแมลงโดยวิธี Liquid Chromatography Mass Spectrometer (LCMS) (Lu *et al*., 2014)

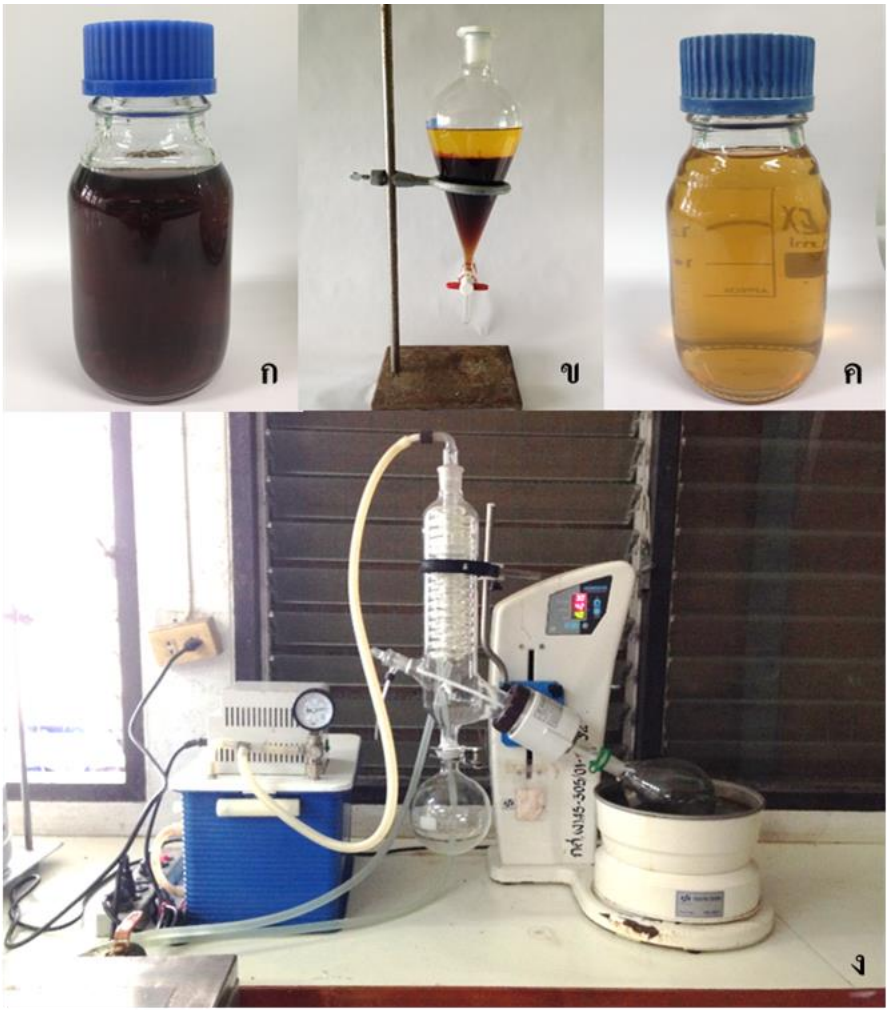
นำเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่มีศักยภาพฆ่าแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* สูงที่สุดจากการทดลองข้อ 6 จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท K8–10 โดยเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. ในจานอาหาร GYMA อายุ 14 วัน เจาะโคโลนีด้วย cock borer ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 มิลลิเมตร จำนวน 5 ชิ้น ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว GYMB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ทั้งหมดจำนวน 5 ลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง shaker จำนวนรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. กรองแยกแยกส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากเส้นใยและสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* sp. ด้วยชุดกรองสุญญากาศ นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง จำนวนรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดแยกน้ำเลี้ยงเชื้อเหนือตะกอน เพื่อเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ ไปสกัดแยกสารทุติยภูมิด้วย ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ไว้สำหรับทดสอบการส่งผลต่อแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะต่างๆ และสำหรับส่งวิเคราะห์ชนิดของสารทุติยภูมิโดยเทคนิค LCMS

8.1 การสกัดสารทุติยภูมิของเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ทำการสกัดแยกสารทุติยภูมิด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ethyl acetate 99.9 เปอร์เซ็นต์ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ผสมกับ ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ใช้แท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar) ร่วมกับเครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) กวนผสมน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์กับ ethyl acetate ที่บรรจุในขวดดูแรน (laboratory bottles) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดแยกสารโดยใช้กรวยแยกสาร (separator funnel) ซึ่งใช้สำหรับสกัดแยกองค์ประกอบของสารละลายที่อยู่ในสถานะของเหลวด้วยตัวทำละลายที่เป็นของเหลวที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน (liquid–liquid extraction) โดยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์จะแยกชั้นกับ ethyl acetate เก็บแยกส่วนชั้นน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ทำการสกัดซ้ำอีกครั้งด้วย ethyl acetate อัตราส่วน 1:1 (v/v) ส่วนชั้น ethyl acetate ที่ได้ทั้งหมดนำมารวมกัน (ภาพที่ 7) จากนั้นนำไประเหย ethyl acetate ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจาก วารุณี, 2551) จนได้สารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมทดสอบต่อไป

8.2 การวิเคราะห์สารทุติยภูมิโดย LCMS

ส่งสารสกัดหยาบที่ได้ตรวจวิเคราะห์สารทุติยภูมิโดยวิธี LCMS ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอ หาดใหญ่ จังหวัด สงขลา



ภาพที่ 7 การสกัดสารทุติยภูมิจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10
(ก) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10
(ข) การสกัดแยกสารโดยใช้กรวยแยกสาร
(ค) ชั้นสาร ethyl acetate ที่ผ่านการสกัดสาร นำไประเหย ethyl acetate ออก
(ง) เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

9. การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ต่อแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะต่างๆ

เตรียมสารละลายสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 50, 30 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายสารสกัดหยาบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ dimethyl sulfoxide (DMSO)ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้ทดสอบกับแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะต่างๆ

9.1 ระยะไข่

นำสารละลายสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 มาทดสอบผลต่อการฟักและการรอดชีวิตของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทรีทเมนต์ประกอบด้วยสารละลายสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 50, 30 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นชุดควบคุม ดำเนินการทดลองจำนวน 6 ซ้ำ ไข่แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* 100 ฟองต่อซ้ำ โดยนำไข่ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* อายุ 1 วัน แช่ในสารละลายสารสกัดหยาบ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween® 20) เป็นเวลา 3 นาที สำหรับชุดควบคุมใช้ปริมาตรเท่ากัน จากนั้นย้ายไข่แมลงวันผลไม้มาวางบนกระดาษกรอง (Whatmann® #1) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ในจานที่มีอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงหนอนแมลงวันผลไม้ปริมาตร 50 กรัม ปิดฝาและนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกจำนวนตัวหนอนที่ฟักออกจากไข่ สำหรับตัวหนอนที่รอดชีวิตให้ย้ายไปเลี้ยงในจานอาหารเทียมจานใหม่ และใส่ไว้ในกล่องพลาสติกใสขนาด 16.5×23.5×9.5 เซนติเมตร สำหรับเลี้ยงแมลงวันผลไม้ ภายในกล่องรองพื้นด้วยขี้เลื่อยละเอียดที่ผ่านการฆ่าเชื้อสูงประมาณ 2 เซนติเมตร สำหรับให้ระยะหนอนดีดตัวเพื่อเข้าดักแด้ บริเวณฝากล่องปิดด้วยผ้ามุ้งระบายอากาศ ดูผลต่อการมีชีวิตรอดในระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย บันทึกจำนวนดักแด้ จำนวนตัวเต็มวัย ระยะการเจริญจากไข่–ตัวหนอน ตัวหนอน–ดักแด้ ดักแด้–ตัวเต็มวัย และลักษณะความผิดปกติของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* แต่ละระยะ คำนวณเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (One–Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์โดยวิธี Tukey's HSD test ด้วยโปรแกรม SPSS version 11 for windows (SPSS, 2001)

9.2 ระยะตัวหนอน

นำสารละลายสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 มาทดสอบในระยะหนอนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทรีทเมนต์ประกอบด้วยสารละลายสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 50, 30 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นชุดควบคุม ดำเนินการทดลองจำนวน 6 ซ้ำ ใช้หนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะที่ 2 จำนวน 20 ตัวต่อซ้ำ โดยเติมสารละลายสารสกัดหยาบปริมาตร 1 มิลลิลิตร สำหรับชุดควบคุมใช้ปริมาตรเท่ากัน ผสมกับอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงหนอนแมลงวันผลไม้ปริมาตร 50 กรัม ในจานอาหารขนาด 5 x 2.5 x 3.5 เซนติเมตร จานอาหารเทียมที่ทดสอบใส่ไว้ในกล่องพลาสติกทรงกลมขนาด 11.8 x 8.5 x 8.7 เซนติเมตร สำหรับเลี้ยงแมลงวันผลไม้ ภายในกล่องรองพื้นด้วยขี้เลื่อยละเอียดที่ผ่านการฆ่าเชื้อสูงประมาณ 2 เซนติเมตร สำหรับให้ระยะหนอนดีดตัวเพื่อเข้าดักแด้ บริเวณฝากล่องปิดด้วยผ้ามุ้งระบายอากาศ ปล่อยให้ตัวหนอนกินอาหารและเจริญที่อุณหภูมิห้อง บันทึกจำนวนตัวหนอนที่ตาย ตัวหนอนที่สามารถเข้าระยะดักแด้ จำนวนตัวเต็มวัย ระยะการเจริญจากตัวหนอน–ดักแด้ และดักแด้–ตัวเต็มวัย ลักษณะความผิดปกติของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในแต่ละระยะ คำนวณเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (One–Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ โดยวิธี Tukey's HSD test ด้วยโปรแกรม SPSS version 11 for windows (SPSS, 2001)

9.3 ระยะดักแด้

นำสารละลายสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 มาทดสอบในระยะดักแด้แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทรีทเมนต์ประกอบด้วยสารละลายสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 50, 30 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นชุดควบคุม ทำจำนวน 6 ซ้ำ ใช้ดักแด้แมลงวันผลไม้อายุ 1 วัน จำนวน 20 ดักแด้ต่อซ้ำ แช่ในสารละลายสารสกัดหยาบ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร (เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween® 20) เป็นระยะเวลา 3 นาที สำหรับชุดควบคุมใช้ปริมาตรเท่ากัน บ่มดักแด้ที่อุณหภูมิห้องไว้ในกล่องพลาสติกทรงกลมขนาด 11.8 x 8.5 x 8.7 เซนติเมตร รองพื้นกล่องและปิดทับดักแด้ด้วยขี้เลื่อยละเอียดที่ผ่านการฆ่าเชื้อสูงประมาณ 2 เซนติเมตร บริเวณฝากล่องปิดด้วยผ้ามุ้งเพื่อระบายอากาศ บันทึกจำนวนตัวเต็มวัยที่ฟัก ระยะการเจริญจากดักแด้–ตัวเต็มวัย ลักษณะความผิดปกติของตัวเต็มวัย คำนวณเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (One–Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ โดยวิธี Tukey's HSD test ด้วยโปรแกรม SPSS version 11 for windows (SPSS, 2001)

9.4 ระยะตัวเต็มวัย

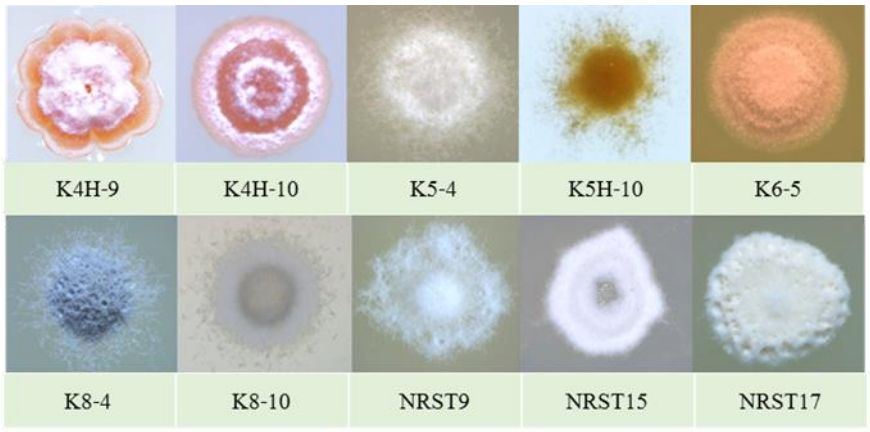
นำสารละลายสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 มาทดสอบในตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทรีทเมนต์ประกอบด้วยสารละลายสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 50, 30 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นชุดควบคุม ทำจำนวน 6 ซ้ำ ใช้ตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้อายุ 1 ถึง 5 วัน หลังจากฟักออกจากดักแด้จำนวน 40 ตัวต่อซ้ำ (เพศผู้ 20 ตัว และเพศเมีย 20 ตัว) นำไปเลี้ยงในกรงผ้ามุ้งขนาด 30x30x30 เซนติเมตร ก่อนการทดสอบให้อดอาหารแมลงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง การทดสอบทำการผสมสารละลายสารสกัดหยาบปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับสารละลายยีสต์ 5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับชุดควบคุมใช้สัดส่วนปริมาตรเท่ากัน จากนั้นปล่อยให้ตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ดูดกินสารดังกล่าวเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และใส่แหล่งน้ำไว้ภายในกรงขณะทดสอบ ย้ายสารสกัดออกจากกรงเมื่อครบ 24 ชั่วโมง และนำอาหารปกติ (ยีสต์ น้ำตาลก้อน และน้ำ) มาใส่ไว้ในกรง บันทึกการตายของตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ทุกวัน เป็นระยะเวลา 15 วัน วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (One–Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์โดยวิธี Tukey's HSD test ด้วยโปรแกรม SPSS version 11 for windows (SPSS, 2001)

บทที่ 3
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

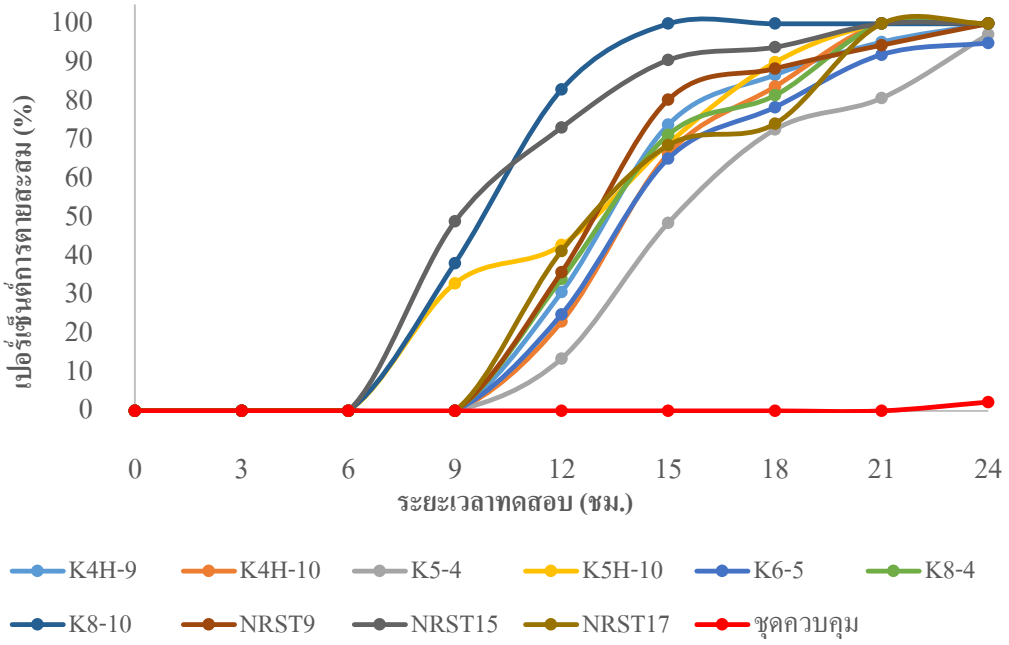
1. การคัดกรองเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay

จากการการคัดกรองเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay จำนวน 52 ไอโซเลท พบเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง ได้แก่ K4H–9, K4H–10, K5–4, K5H–10, K6–5, K8–4, K8–10, NRST9, NRST15 และ NRST17 ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง (ภาพที่ 8) โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของอาร์ทีเมียมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 9) โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลท K8–10 ออกฤทธิ์ฆ่าอาร์ทีเมียได้มากที่สุด 83 ± 8.3 เปอร์เซ็นต์ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง แตกต่างจากไอโซเลทอื่นๆ และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ส่วนที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท ที่สามารถฆ่าอาร์ทีเมียได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ K5H–10, K8–10, NRST9, NRST15 และ NRST17 วิเคราะห์ค่า Kaplan–Meier survival analysis พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 10 ไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยการรอดชีวิต (Average Survival Time, AST) ของอาร์ทีเมียอยู่ระหว่าง 11.3–17.4 ชั่วโมง น้อยกว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลทอื่นๆ และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.05) ส่วนชุดควบคุมพบค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตเท่ากับ 24 ชั่วโมง ที่ระยะเวลาทดสอบการตายของอาร์ทีเมีย 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4) การออกฤทธิ์ฆ่าอาร์ทีเมียของเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 10 ไอโซเลท มีค่าเปอร์เซ็นต์การตายใกล้เคียงกับการศึกษาของ Tantithanagorngul และคณะ (2011) ที่ทำการคัดเลือกเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทจากดินทั้งหมด 459 ไอโซเลท เพื่อคัดกรองสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงโดยเทคนิค brine shrimp bioassay พบเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 3 ไอโซเลท ที่ทำให้อาร์ทีเมียตาย 99–100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าเชื้อ *S. antibioticus* เป็นไอโซเลทที่ทำให้มีการตายสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *S. griseoruber* และ *S. sparsogines* ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การตาย 99.49 และ 99.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ Samri และคณะ (2015) รายงานการคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 210 ไอโซเลท ด้วยวิธีเดียวกัน พบเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 22 ไอโซเลท ที่ทำให้อาร์ทีเมียตาย 80–100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 12 ไอโซเลท ที่ส่งผลให้อาร์ทีเมียมีเปอร์เซ็นต์การตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า LT_{50}

อยู่ในช่วงระหว่าง 1–22 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อที่ทำการศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่มีค่า LT_{50} มากกว่า 9 ชั่วโมง จากการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค brine shrimp bioassay



ภาพที่ 8 เชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay



ภาพที่ 9 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay

ตารางที่ 4 ค่าเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมและค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตของอาร์ทีเมีย จากการทดสอบคุณสมบัติการฆ่าแมลงของเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay

ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (%) (mean ± SE)[1/]		Kaplan–Meier Survival Analysis	
	12 ชม.	24 ชม.	ค่าเฉลี่ยการรอดชีวิต (ชม.) (AST) (mean ± SE)[2/]	ช่วงความเชื่อมั่น (ชม.)
K4H–9	30.6 ± 1.4^{abc}	100.0 ± 0.0^{a}	16.0 ± 0.6^{b}	14.7–17.3
K4H–10	23.0 ± 3.2^{bc}	100.0 ± 0.0^{a}	16.3 ± 0.6^{b}	15.1–17.5
K5–4	13.5 ± 2.6^{c}	97.2 ± 2.8^{a}	17.4 ± 0.7^{b}	16.0–18.8
K5H–10	42.8 ± 20.0^{abc}	100.0 ± 0.0^{a}	14.3 ± 0.9^{bc}	12.6–16.0
K6–5	24.9 ± 6.6^{bc}	95.0 ± 2.5^{a}	16.3± 0.7^{b}	14.9–17.7
K8–4	34.1 ± 8.3^{abc}	100.0 ± 0.0^{a}	15.5 ± 0.6^{b}	14.3–16.7
K8–10	83.0 ± 8.3^{a}	100.0 ± 0.0^{a}	11.3 ± 0.4^{d}	10.5–12.1
NRST9	35.8 ± 8.4^{abc}	100.0 ± 0.0^{a}	15.2 ± 0.6^{b}	13.9–16.5
NRST15	73.2 ± 10.3^{ab}	100.0 ± 0.0^{a}	12.0 ± 0.0^{cd}	10.6–13.4
NRST17	41.3 ± 12.3^{abc}	100.0 ± 0.0^{a}	15.3 ± 0.0^{b}	14.0–16.6
Control	0.0 ± 0.0^{d}	2.2 ± 2.2^{b}	24.0 ± 0.0^{a}	24.0–24.0

[1/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD test

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี log–rank test ค่าเฉลี่ยการรอดชีวิต (AST) จำกัดที่ 24 ชั่วโมง

2. การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการฆ่าแมลง

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท จากการศึกษาเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลง มาทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการฆ่าแมลง โดยแบ่งการทดลองย่อยดังนี้

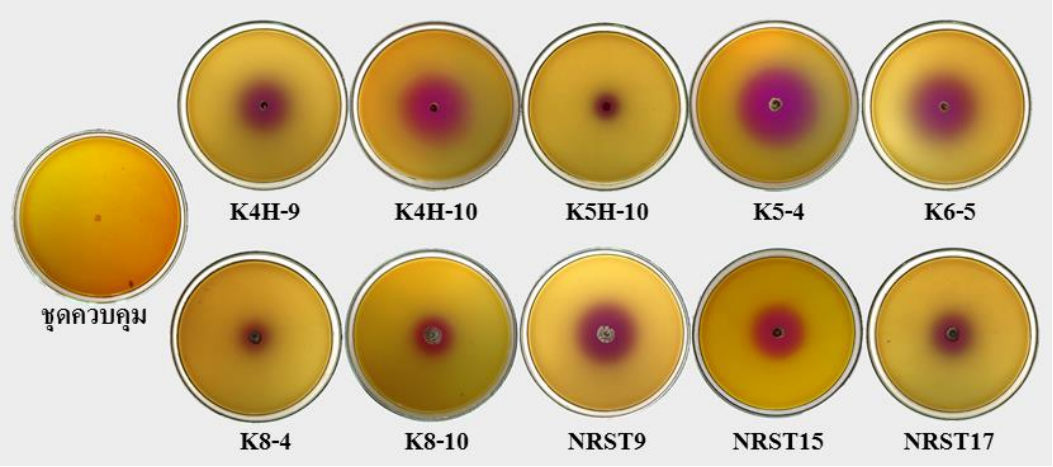
2.1 ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (chitinase)

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคติเนส ที่ระยะเวลา 3, 5 และ 7 วัน เชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 10 ไอโซเลท ได้แก่ K4H–9, K4H–10, K5–4, K5H–10, K6–5, K8–4, K8–10, NRST9, NRST15 และ NRST17 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคติเนส (ตารางที่ 5) (ภาพที่ 10) สามารถย่อย substrate ในจานอาหาร GYMA ที่ผสม 1% colloidal chitin เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีม่วงรอบโคโลนีได้ตั้งแต่ระยะเวลา 3 วัน ของการทดสอบ และมีการขยายขนาดวงสีม่วงรอบโคโลนีเพิ่มขึ้นที่ระยะเวลา 5 และ 7 วัน พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลท K5–4 เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีม่วงรอบโคโลนีมากที่สุด ที่ระยะเวลา 7 วัน มีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 5.21 ± 0.13 เซนติเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลท K6–5, K4H–10 และ K4H–9 มีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 5.03 ± 0.50, 4.98 ± 0.23 และ 4.71 ± 0.24 เซนติเมตร ตามลำดับ แตกต่างจากเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลทอื่นๆและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสสอดคล้องกับการรายงานการศึกษาเชื้อ *Streptomyces* spp. ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคติเนส โดยทำการศึกษาเชื้อ *S. exfoliatus* MT9 บนอาหารแข็งที่ผสม colloidal chitin พบว่า *S. exfoliatus* MT9 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและย่อยไคตินเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน (Choudhary *et al*., 2015) และจากการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีท 38 ไอโซเลท พบว่ามี 3 ไอโซเลท ได้แก่ *Actinoplanes philippinensis*, *A. missouriensis* และ *S. clavuligerus* สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ในปริมาณสูง ส่งผลให้แมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* เกิดความผิดปกติในระยะดักแด้และมีอัตราการรอดชีวิตลดลง (Gadelhak *et al*., 2005)

ตารางที่ 5 ดัชนีการสร้างเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) ของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ดัชนีเอนไซม์ (ซม.) (mean ± SE) [1/]		
	3 วัน	5 วัน	7 วัน
K4H–9	3.33 ± 0.21^{b}	4.60 ± 0.32^{a}	4.90 ± 0.24^{a}
K4H–10	2.83 ± 0.25^{b}	3.90 ± 0.19^{b}	4.98 ± 0.23^{a}
K5–4	2.16 ± 0.10^{c}	3.80 ± 0.18^{b}	5.21 ± 0.13^{a}
K5H–10	1.17 ± 0.05^{d}	1.30 ± 0.03^{f}	2.00 ± 0.05^{cd}
K6–5	4.03 ± 0.15^{a}	5.00 ± 0.14^{a}	5.03 ± 0.50^{a}
K8–4	1.07 ± 0.04^{d}	1.70 ± 0.09^{ef}	1.92 ± 0.17^{d}
K8–10	2.15 ± 0.05^{c}	2.20 ± 0.08^{de}	2.72 ± 0.17^{bc}
NRST9	1.60 ± 0.09^{cd}	2.40 ± 0.12^{de}	3.44 ± 0.13^{b}
NRST15	1.08 ± 0.00^{d}	3.21 ± 0.08^{bc}	3.45 ± 0.28^{b}
NRST17	1.19 ± 0.05^{d}	2.82 ± 0.09^{cd}	3.04 ± 0.15^{b}

[1/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD test



ภาพที่ 10 การสร้างเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) ของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท ที่อายุ 7 วัน เชื้อ *Streptomyces* spp. สร้างเอนไซม์ไคติเนสย่อย substrate เกิดวงสีม่วงรอบโคโลนี

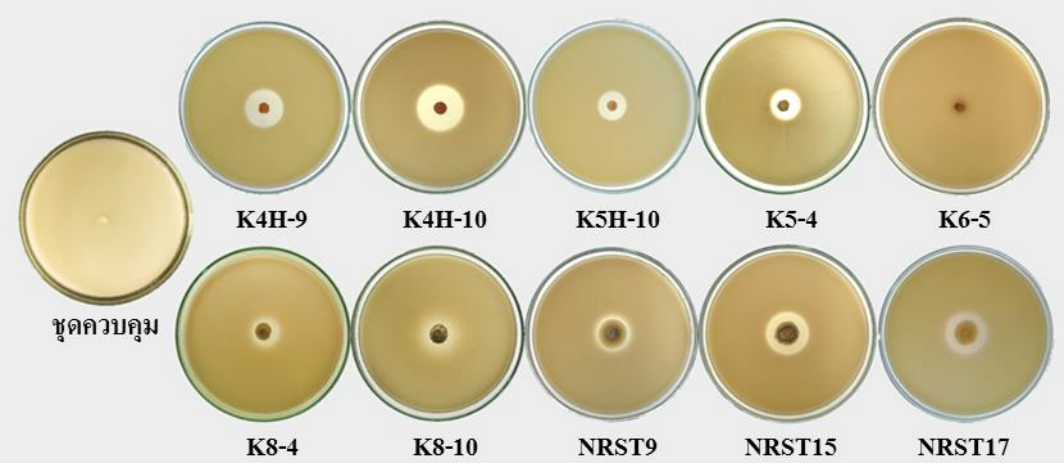
2.2 ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (protease)

การทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ที่ระยะเวลา 3, 5 และ 7 วัน พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ K4H–9, K4H–10, K5–4, K5H–10, K8–4, K8–10, NRST9, NRST15 และ NRST17 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ย่อย substrate ในจานอาหาร GYMA ที่ผสม 3% skim milk สร้างวงใสรอบโคโลนี (ตารางที่ 6) (ภาพที่ 11) เชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 9 ไอโซเลท สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ตั้งแต่ระยะเวลา 3 วัน ที่ทำการทดสอบ โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. K4H–10 สร้างวงใสรอบโคโลนีมากที่สุดที่ระยะเวลา 7 วัน โดยมีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 3.38 ± 0.15 เซนติเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลท K4H–9, K5–4 และK5H–10 มีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 3.23 ± 0.02, 2.57 ± 0.09 และ 2.38 ± 0.02 เซนติเมตร ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าไอโซเลท K6–5 ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส แตกต่างจากเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลทอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความสามารถของเอนไซม์โปรติเอสส่งผลต่อการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังลำตัวแมลงและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงหรือสิ่งมีชีวิตที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ โดยจาการศึกษาเอนไซม์โปรติเอสที่สร้างจากเชื้อ *S. griseolus* ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในระยะไข่ของพยาธิใบไม้ตับ (El–Gammal *et al.,* 2014) อีกทั้งมีการใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ *S. griseus*, *S. rimosus* และ *S. thermovulgari* ซึ่งมีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลง โดยมีการนำมาใช้ประโยชน์เป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่มีศักยภาพทดแทนสารเคมี (Harrison and Bonning, 2010)

ตารางที่ 6 ดัชนีการสร้างเอนไซม์โปรติเอส (protease) ของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ดัชนีเอนไซม์ (ซม.) (mean ± SE) [1/]		
	3 วัน	5 วัน	7 วัน
K4H–9	1.93 ± 0.08^{a}	3.18 ± 0.02^{a}	3.23 ± 0.02^{a}
K4H–10	1.73 ± 0.27^{ab}	2.62 ± 0.12^{b}	3.38 ± 0.15^{a}
K5H–10	1.34 ± 0.06^{c}	1.52 ± 0.05^{de}	2.38 ± 0.02^{bc}
K5–4	1.22 ± 0.06^{c}	1.82 ± 0.06^{cd}	2.57 ± 0.09^{b}
K6–5	0.00 ± 0.00^{d}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
K8–4	1.19 ± 0.03^{c}	1.23 ± 0.03^{e}	1.76 ± 0.04^{d}
K8–10	1.76 ± 0.08^{a}	1.39 ± 0.22^{de}	2.31 ± 0.05^{bc}
NRST9	1.42 ± 0.07^{bc}	1.26 ± 0.03^{e}	1.35 ± 0.01^{e}
NRST15	1.34 ± 0.09^{c}	1.51 ± 0.07^{de}	1.75 ± 0.02^{de}
NRST17	2.02 ± 0.07^{a}	2.06 ± 0.10^{c}	2.10 ± 0.10^{cd}

[1/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD test

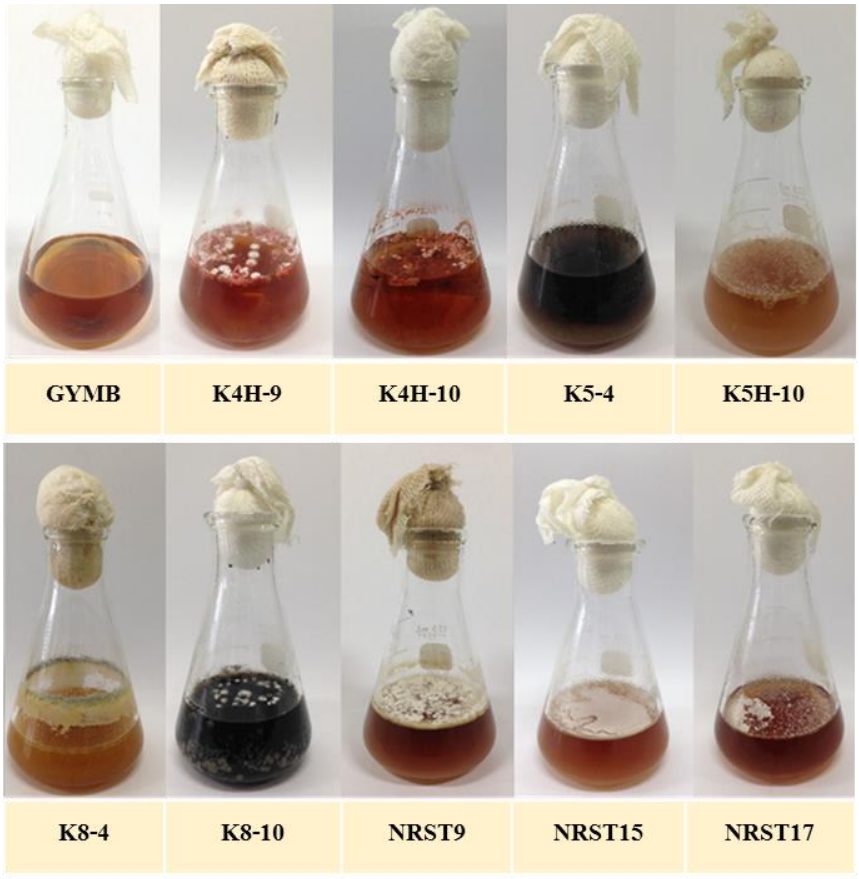


ภาพที่ 11 การสร้างเอนไซม์โปรติเอส (protease) ของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท ที่อายุ 7 วัน เชื้อ *Streptomyces* spp. สร้างเอนไซม์โปรติเอสย่อย substrate เกิดวงใสรอบโคโลนี

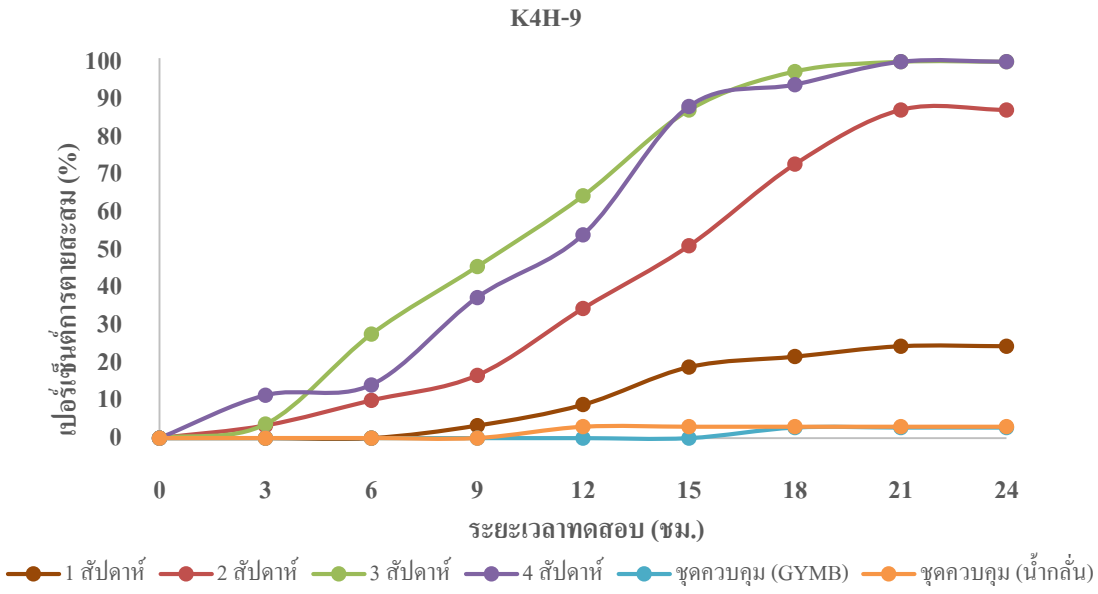
3. การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลง โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay

จากการศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในอาหารเหลว GYMB (ภาพที่ 12) ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay ของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ K4H–9, K4H–10, K5H–10, K5–4, K8–4, K8–10, NRST9, NRST15 และ NRST17 (ไอโซเลท K6–5 ตรวจพบอยู่ในกลุ่มก่อโรคในมนุษย์จึงไม่นำมาทดสอบต่อ) ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ (ตารางภาคผนวก 1) พบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. มีผลต่ออัตราการตายของอาร์ทีเมียที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 13–ภาพที่ 21) และระยะเวลาการเลี้ยงที่เหมาะสมทำให้ประสิทธิภาพน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *Streptomyces* spp. ทุกไอโซเลทที่ทำการทดสอบ สามารถออกฤทธิ์ฆ่าอาร์ทีเมียได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เหมาะสำหรับการเลี้ยงที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ ได้แก่ K5–4, K8–4, NRST9, NRST15 และ NRST17 โดยระยะเวลาการเลี้ยงที่ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ สามารถออกฤทธิ์ฆ่าอาร์ทีเมียได้ 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ไอโซเลทที่เหมาะสำหรับการเลี้ยงที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์ ได้แก่ K8–10 มีประสิทธิภาพออกฤทธิ์ฆ่าอาร์ทีเมีย 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 15 ชั่วโมง เทียบเท่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลา 3 และ 4 สัปดาห์ แตกต่างจากระยะเวลาการเลี้ยงที่ 1 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งออกฤทธิ์ฆ่าอาร์ทีเมียได้เพียง 86.31 ± 3.73 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ไอโซเลทที่เหมาะสำหรับการเลี้ยงที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ ได้แก่ K4H–9, K4H–10 และ K5H–10 สามารถออกฤทธิ์ฆ่าอาร์ทีเมียได้ 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าระยะเวลาการเลี้ยงที่ 1 และ 2 สัปดาห์ และที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 3 สัปดาห์ ทำให้การฆ่าอาร์ทีเมียมีเปอร์เซ็นต์การตายไม่แตกต่างกับระยะเวลาการเลี้ยงที่ 4 สัปดาห์ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของวารุณี (2551) พบว่าเชื้อ *Streptomyces* ในแต่ละสายพันธุ์มีระยะเวลาในการเจริญที่แตกต่างกันซึ่งส่งผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิและอัตราการใช้สารอาหารที่แตกต่างกันด้วย โดยจากการศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 442, 449 และ O145702 ทำการเลี้ยงในอาหารเหลว Luria–Bertani (LB) และทดสอบการฆ่าอาร์ทีเมีย พบว่าที่ระยะเวลาการเลี้ยง 4 วัน ไอโซเลท 449 สร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง ส่งผลให้อาร์ทีเมีย มีการตาย 91.16 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ระยะเวลาการเลี้ยง 5 วัน ไอโซเลท 442 และ O145702 ส่งผลให้อาร์ทีเมียตาย 98.58 และ 91.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้ความรุนแรงของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงมีแนวโน้มค่อยๆลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงยาวนานขึ้น เนื่องจากปริมาณสารอาหารที่เชื้อต้องการใช้ในการเจริญลดลง ซึ่งส่งผลต่อความสามารถ

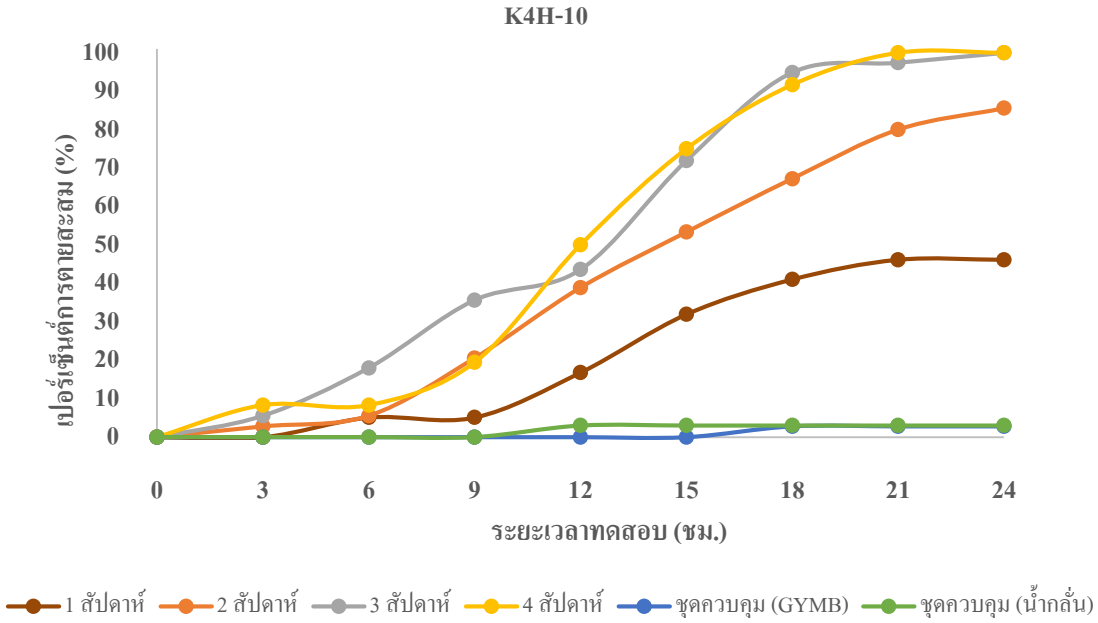
ในการผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อในแต่ละสายพันธุ์ และพบว่ามีปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิ โดยเชื้อในกลุ่ม Actinomycetes ต้องการออกซิเจนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเจริญและสร้างสารปฏิชีวนะ (Wang *et al*., 1999) ค่า pH ที่ใช้ในการเลี้ยงประมาณ 7 เป็นระดับที่เหมาะสมในการผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อ *Streptomyces* spp. (Saadoun *et al*.,1999) รวมทั้งปริมาณและแหล่งไนโตรเจน (Rafieenia, 2013) แหล่งคาร์บอน (Jonsbu *et al*., 2002) สามารถชักนำให้เชื้อ *Streptomyces* spp. ในแต่ละสายพันธุ์ผลิตสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้นอีกด้วย



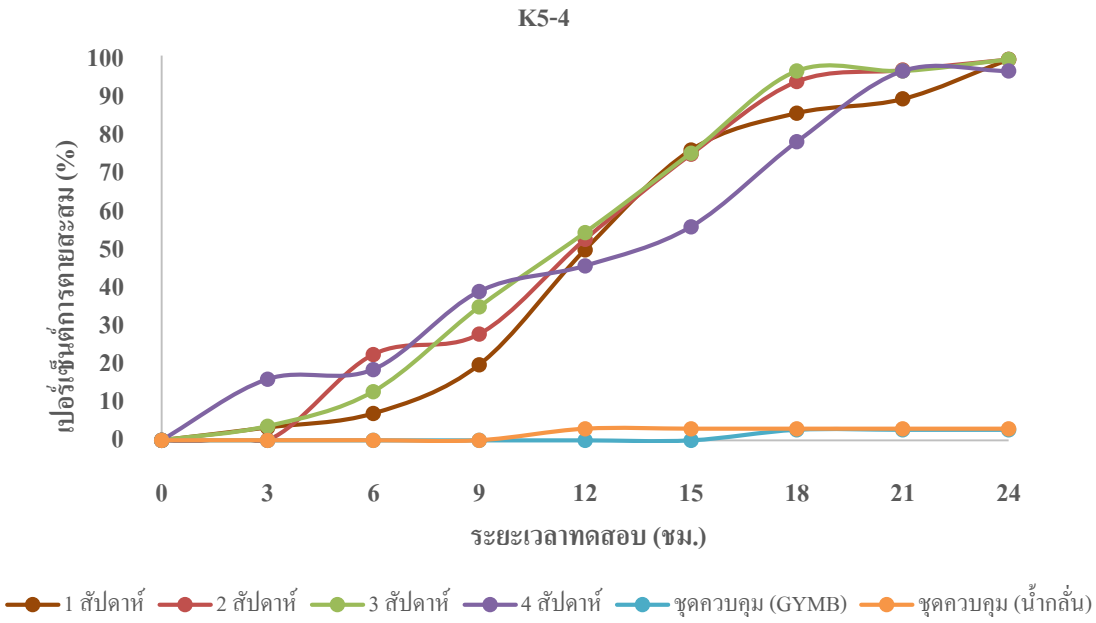
ภาพที่ 12 เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GYMB ที่อายุ 14 วัน



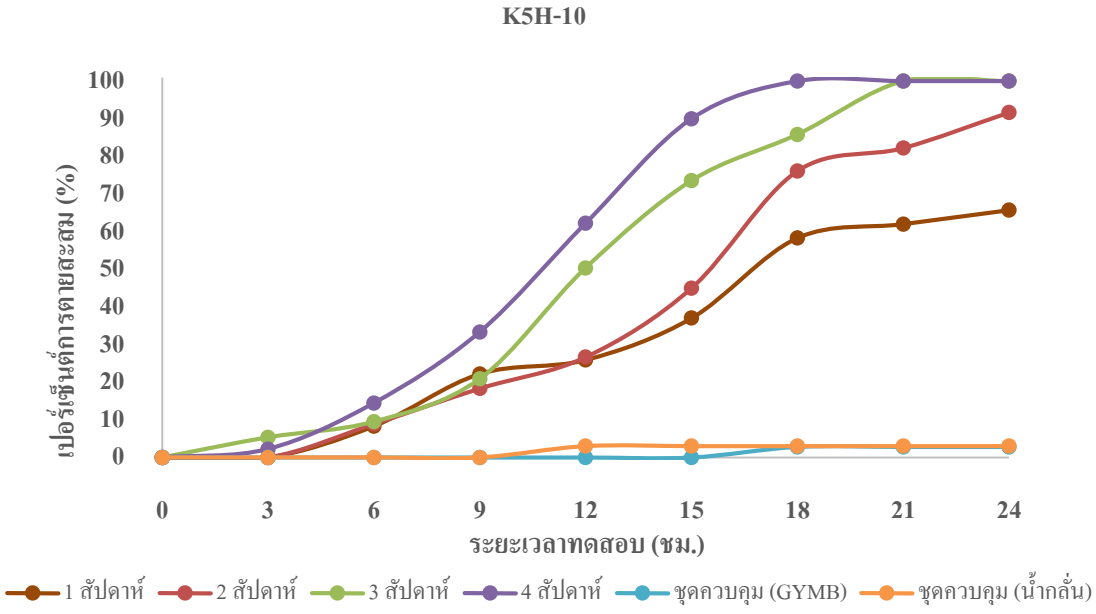
ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. K4H–9 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ



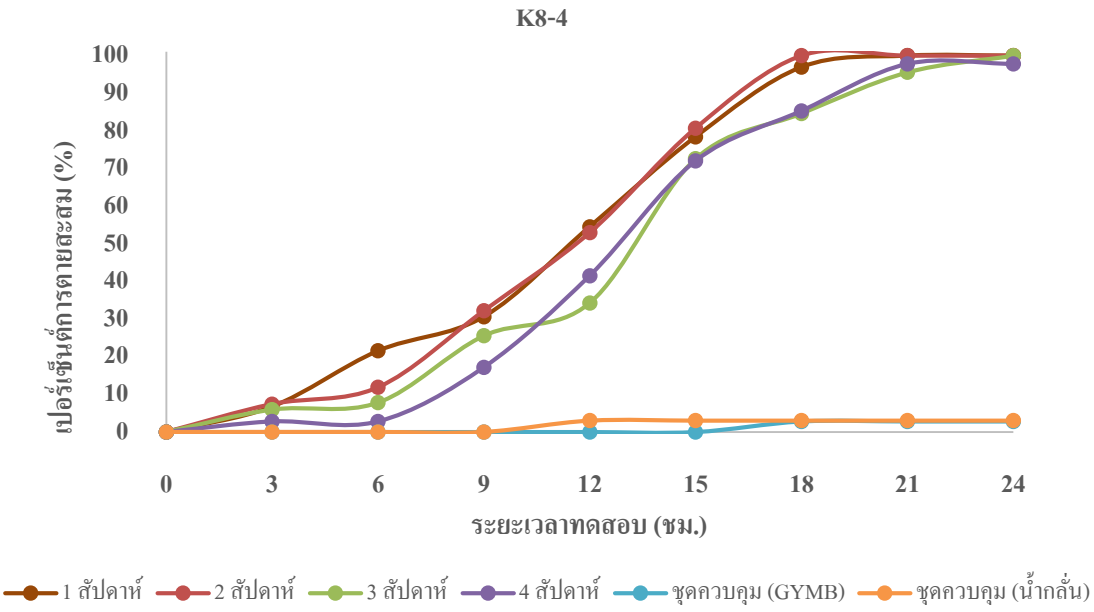
ภาพที่ 14 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. K4H–10 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ



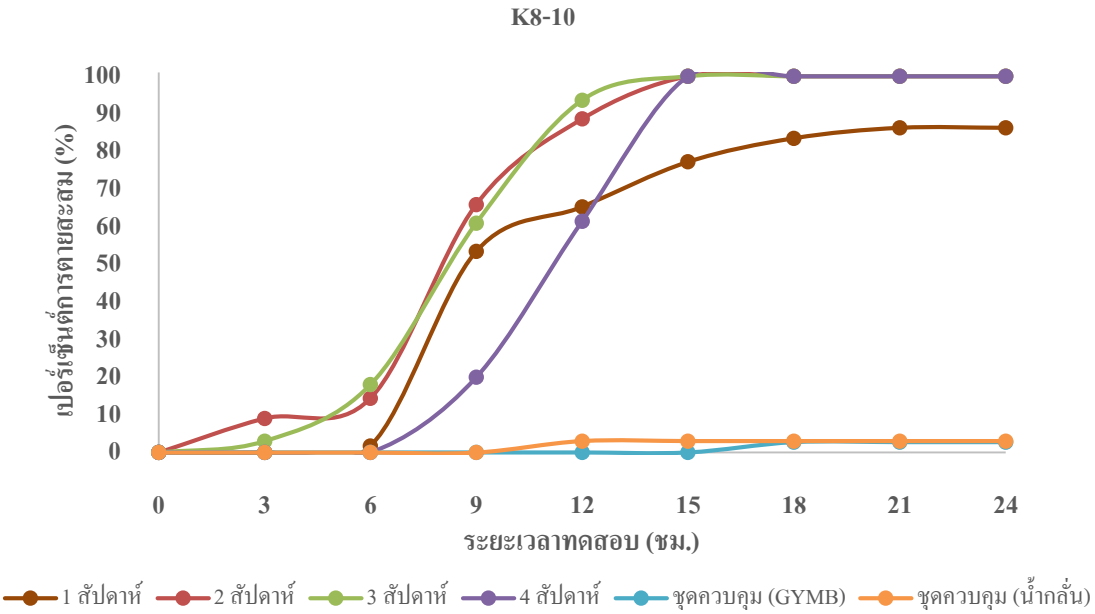
ภาพที่ 15 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. K5–4 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ



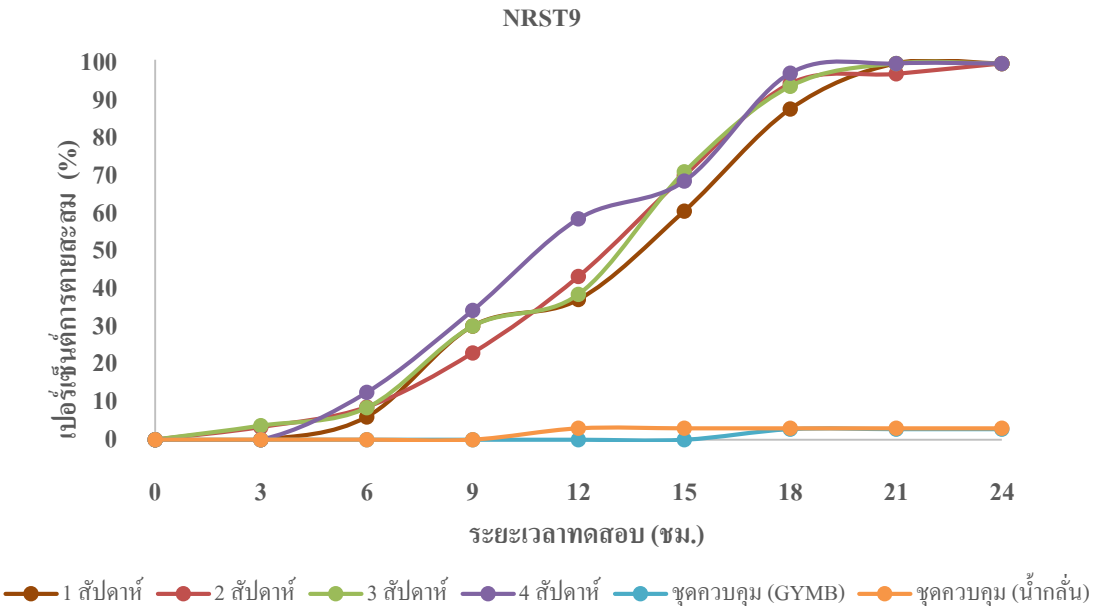
ภาพที่ 16 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. K5H–10 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ



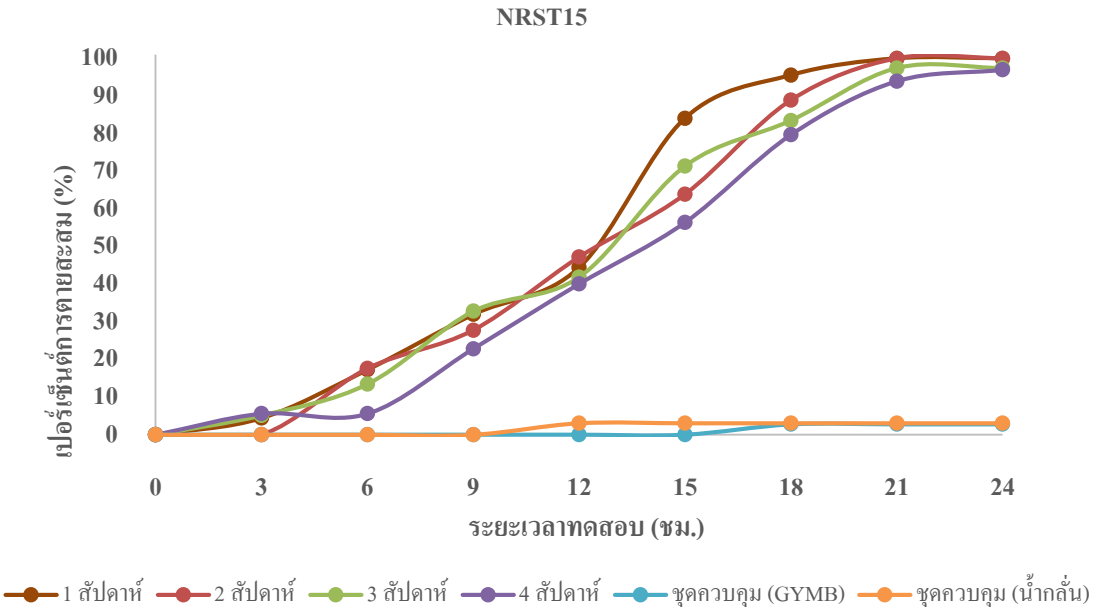
ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. K8–4 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ



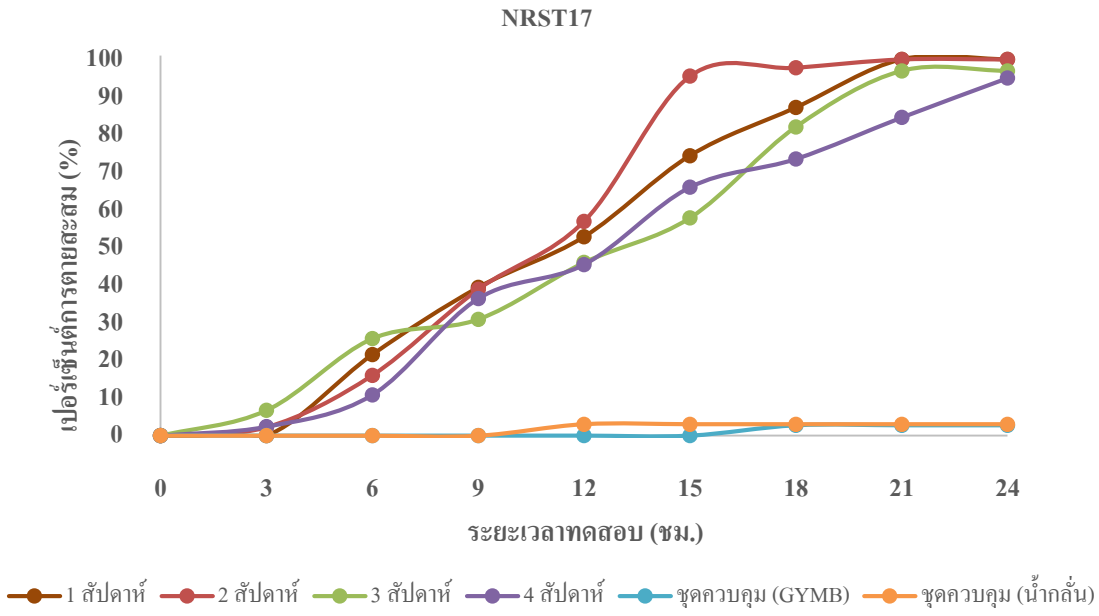
ภาพที่ 18 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. K8–10 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ



ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. NRST9 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ



ภาพที่ 20 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. NRST15 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ



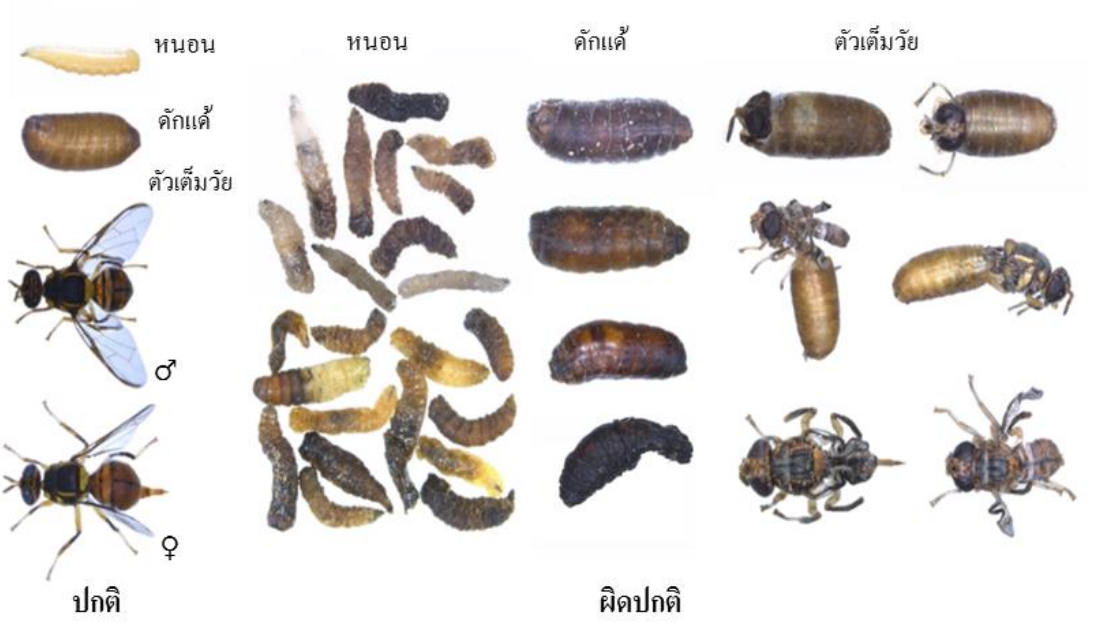
ภาพที่ 21 เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยสะสมของอาร์ทีเมีย ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. NRST17 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ

4. การคัดกรองน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ส่งผลต่อการเจริญของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะหนอน (ทดสอบเบื้องต้น)

จากการคัดกรองน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ K4H–9, K4H–10, K5H–10, K5–4, K8–4, K8–10, NRST9, NRST15 และ NRST17 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่เหมาะสม และนำมาคัดกรองเพื่อหาเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลทที่สามารถออกฤทธิ์ต่อการเจริญของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะหนอน ผลการคัดกรองพบเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ K8–10, NRST15 และ NRST17 ที่ส่งผลต่อการเจริญของหนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* โดยทำให้มีการตายและเกิดความผิดปกติในแต่ละระยะ ส่งผลให้มีการรอดชีวิตเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ลดลง เชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลท K8–10 ส่งผลให้เกิดความผิดปกติและมีการตายสูงสุด โดยหนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ 60.38 ± 3.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ NRST17 และ NRST15 หนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* มีการรอดชีวิตเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ 73.33 ± 4.01 และ 77.50 ± 5.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุม หนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* มีการรอดชีวิตเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ 94.17 ± 2.39 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากไอโซเลทอื่นๆและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลท ส่งผลให้มีการตายและเกิดความผิดปกติได้ในระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย (ภาพที่ 22) โดยไอโซเลท K8–10 ส่งผลให้หนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* มีเปอร์เซ็นต์การตายและเกิดความผิดปกติในแต่ละระยะสูงสุด พบการตายในระยะหนอน 16.67 ± 2.47 เปอร์เซ็นต์ ระยะดักแด้ 13.33 ± 2.47 เปอร์เซ็นต์และเป็นไอโซเลทเดียวที่พบความผิดปกติทำให้ดักแด้มีขนาดเล็กแคระแกรน ส่งผลให้มีน้ำหนักดักแด้เฉลี่ยเพียง 12.65 ± 0.15 มิลลิกรัม สำหรับ NRST15 และ NRST17 ทำให้มีการตายระยะหนอน ระยะดักแด้ และมีน้ำหนักดักแด้ใกล้เคียงกัน โดยมีการตายระยะหนอน 10.00 ± 3.16 และ 10.00 ± 2.89 เปอร์เซ็นต์ ระยะดักแด้ 11.67 ± 2.11 และ 11.67 ± 2.11 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักดักแด้เฉลี่ย 13.83 ± 0.07 และ 13.02 ± 0.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7) จากการศึกษาการคัดกรองน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ส่งผลต่อการเจริญของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะหนอน (ทดสอบเบื้องต้น) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ซึ่งส่งผลต่อการเจริญของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* สูงสุดจากการทดสอบ สำหรับทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ พบไอโซเลทที่มีความสามารถออกฤทธิ์ควบคุมแมลง โดยส่งผลต่อการเจริญและทำให้แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* รอดชีวิตลดลง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าแมลงในอันดับ

Diptera ได้เช่นกัน โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. rochei , S. minutiscleroticus* และ *S. phaeoluteigrisseus* ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ได้สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Anwar *et al*., 2014) เชื้อ *S. avermitilis* และ *S. pactum* สามารถออกฤทธิ์ฆ่าหนอนแมลงวันบ้าน *M. domestica* ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การตาย 95 และ 75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Yamac *et al*., 2010) และเชื้อ *Streptomyces* spp. ยังสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงอีกหลายกลุ่มขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และความรุนแรงของเชื้อ *Streptomyces* spp. เช่น เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าแมลงในอันดับ Lepidoptera ได้แก่ เชื้อ *S. hydogenans* DH16 ออกฤทธิ์ฆ่าหนอนกระทู้ผัก *S. litura* (Kaur *et al*., 2014) เชื้อ *S. griseoplanus*, *S. bacillaris* และ *S. albolongus* สามารถออกฤทธิ์ฆ่าหนอนเจาะสมอฝ้าย *H. armigera* และหนอนกระทู้ผัก *S. litura* (Vijayabharathi *et al*., 2014) ในอันดับ Coleoptera เชื้อ *S. avermitilis* สามารถออกฤทธิ์ฆ่าหนอนด้วงมันฝรั่ง *Leptinotarsa decemlimeata* (Tomilova *et al*., 2016) ในอันดับ Homoptera เชื้อ *S. laindensis* H008 ออกฤทธิ์ฆ่าเพลี้ยอ่อน *Lipaphis erysimi* (Xu *et a*l., 2016) เป็นต้น



ภาพที่ 22 ลักษณะความผิดปกติของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะหนอน ระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย ที่ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในหนอนระยะที่ 2

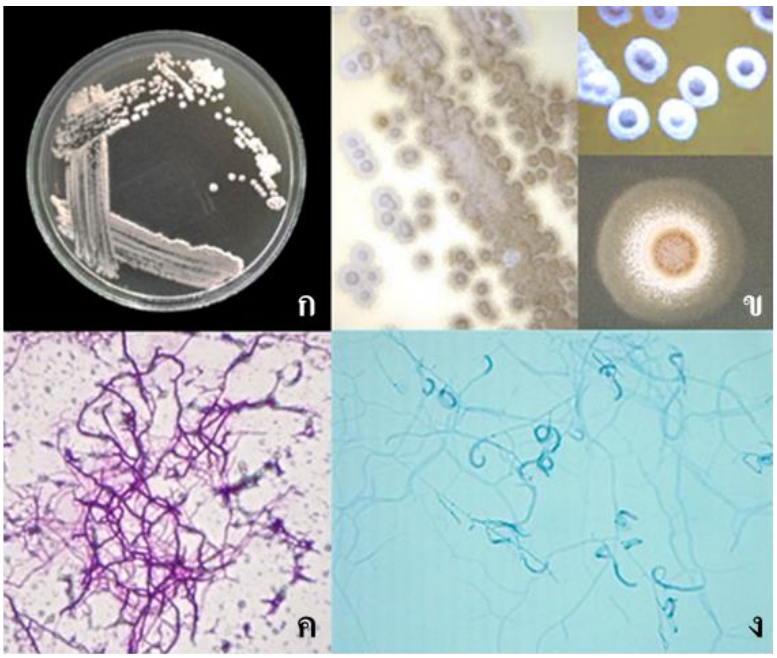
ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 9 ไอโซเลท ต่อแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะหนอน

ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ (mean ± SE) [1/]						
	หนอนตาย	เข้าดักแด้	น้ำหนักดักแด้ (มิลลิกรัม)	ดักแด้ตาย	ลอกคราบไม่สมบูรณ์	ตัวเต็มวัยผิดปกติ	ตัวเต็มวัยสมบูรณ์
K4H–9	8.33 ± 3.80^{b}	91.67 ± 3.80^{ab}	13.90 ± 0.07^{a}	1.67 ± 1.67^{c}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{b}	90.00 ± 3.42^{ab}
K4H–10	2.50 ± 1.12^{b}	97.50 ± 1.12^{a}	14.25 ± 0.08^{a}	2.50 ± 1.12^{bc}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{b}	95.00 ± 1.83^{a}
K5–4	2.50 ± 1.12^{b}	97.50 ± 1.12^{a}	14.15 ± 0.10^{a}	2.50 ± 1.71^{bc}	0.00 ± 0.00^{c}	$0.83 \pm 0.83a^{b}$	94.17 ± 3.27^{a}
K5H–10	3.33 ± 1.67^{b}	96.67 ± 1.67^{a}	14.12 ± 0.15^{a}	5.00 ± 2.58^{abc}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{b}	91.67 ± 2.79^{ab}
K8–4	3.33 ± 1.67^{ab}	96.67 ± 1.67^{a}	13.92 ± 0.08^{a}	1.67 ± 1.67^{c}	1.67 ± 1.67^{bc}	0.00 ± 0.00^{b}	93.33 ± 2.47^{a}
K8–10	16.67 ± 2.47^{a}	83.33 ± 2.47^{b}	12.65 ± 0.15^{b}	13.33 ± 2.47^{a}	3.33 ± 2.47^{a}	3.33 ± 1.67^{a}	60.38 ± 3.00^{d}
NRST9	3.33 ± 1.67^{b}	96.67 ± 1.67^{a}	14.08 ± 0.15^{a}	3.33 ± 1.67^{bc}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{b}	93.33 ± 2.11^{a}
NRST15	10.00 ± 3.16^{ab}	90.00 ± 3.16^{ab}	13.83 ± 0.07^{a}	11.67 ± 2.11^{ab}	0.83 ± 0.83^{c}	0.00 ± 0.00^{b}	77.50 ± 5.12^{bc}
NRST17	10.00 ± 2.89^{ab}	90.00 ± 2.89^{ab}	13.02 ± 0.25^{b}	11.67 ± 2.11^{ab}	4.17 ± 0.83^{ab}	0.83 ± 0.83^{ab}	73.33 ± 4.01^{cd}
ชุดควบคุม	1.67 ± 1.05^{b}	98.33 ± 1.05^{a}	13.93 ± 0.07^{a}	3.33 ± 1.67^{bc}	0.00 ± 0.00^{c}	0.83 ± 0.83^{ab}	94.17 ± 2.39^{a}

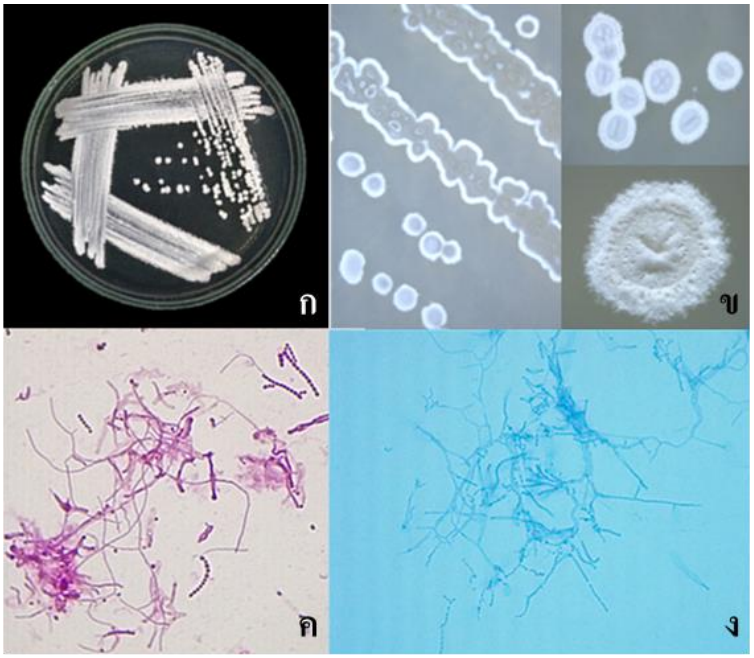
[1/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD test

5. การศึกษาสัณฐานวิทยาและจำแนกชนิดเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพโดยวิธีทางอณูวิทยา

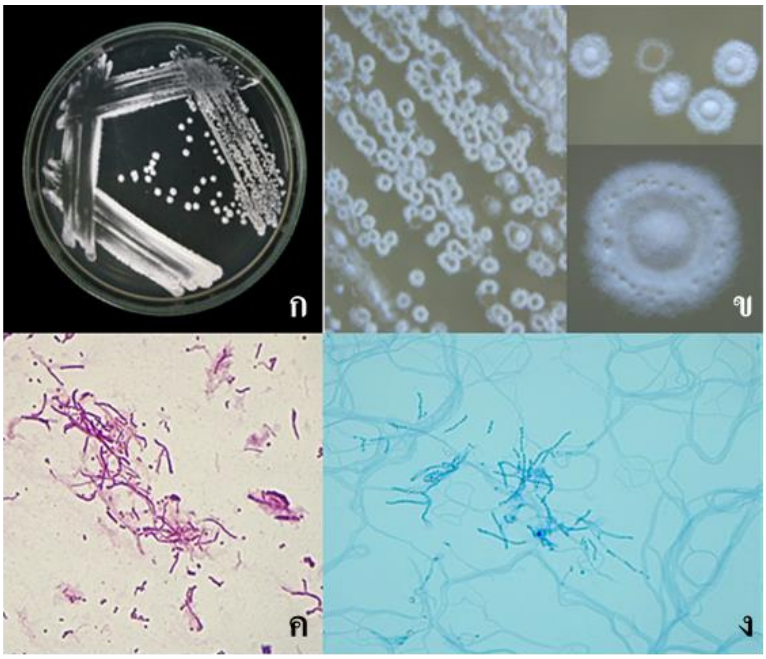
จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ K8–10, NRST15 และ NRST17 (จากการคัดกรองน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ส่งผลต่อการเจริญของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะหนอน) พบว่าลักษณะโคโลนีบนจานอาหารสีของโคโลนี และการสร้างสายสปอร์ เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 มีลักษณะแตกต่างจากไอโซเลท NRST15 และ NRST17 ซึ่งมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 (ภาพที่23) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะโคโลนีสีขาวในระยะแรกและมีสีน้ำตาลอมเทาเมื่อเจริญเต็มที่ การเจริญสร้างสปอร์เรียงต่อเป็นสายยาวรูปโค้งแบบ spiral สำหรับไอโซเลท NRST15 และNRST17 ซึ่งมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันไอโซเลท NRST15 (ภาพที่24) และ NRST17 (ภาพที่25) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ตลอดระยะการเจริญมีลักษณะโคโลนีสีขาว การเจริญสร้างสปอร์เรียงต่อเป็นสายยาวตรงแบบ rectiflexibiles



ภาพที่ 23 เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ที่อายุ 14 วัน (ก) การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA (ข) ลักษณะโคโลนี (ค) การติดสีแกรมบวก และ (ง) ลักษณะสายสปอร์

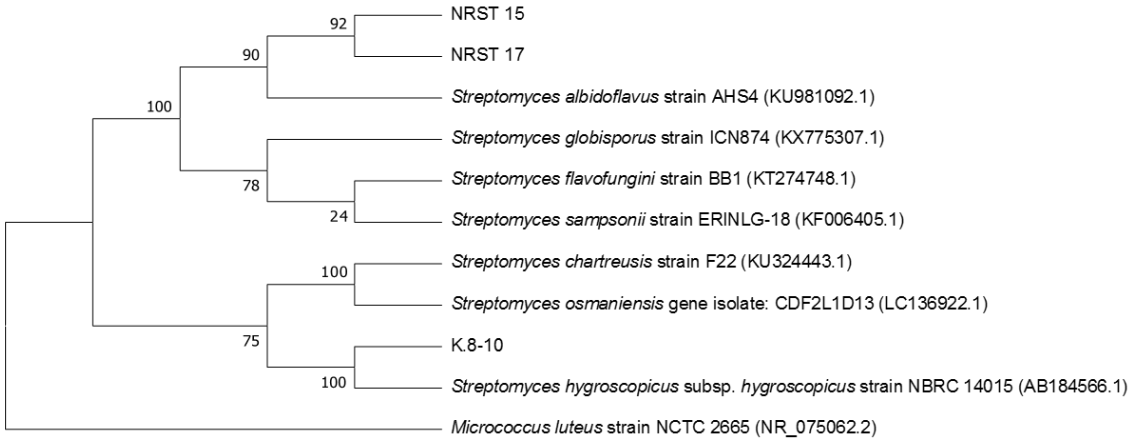


ภาพที่ 24 เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท NRST15 ที่อายุ 7 วัน (ก) การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA (ข) ลักษณะโคโลนี (ค) การติดสีแกรมบวก และ (ง) ลักษณะสายสปอร์



ภาพที่ 25 เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท NRST17 ที่อายุ 7 วัน (ก) การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA (ข) ลักษณะโคโลนี (ค) การติดสีแกรมบวก และ (ง) ลักษณะสายสปอร์

สำหรับการจำแนกเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลท K8–10 , NRST15 และ NRST17 ด้วยวิธีทางอณูวิทยา หลังจากทำการสกัด DNA ของเชื้อ *Streptomyces* spp. และเพิ่มปริมาณ DNA ในตำแหน่ง 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primer คู่ไพรเมอร์ forward primer 27F (5′ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3′) และ reward primer 1492R (5′ GGTTACCTTGTTACGACTT 3′) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเทียบเคียงชนิดบนฐานข้อมูล GenBank และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 จำแนกชนิดเป็น *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* strain NBRC 14015 ซึ่งมีความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท NRST15 และ NRST17 เป็นชนิดเดียวกัน คือ *S. albidoflavus* strain AHS4 ซึ่งมีความเหมือน 98 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 26)



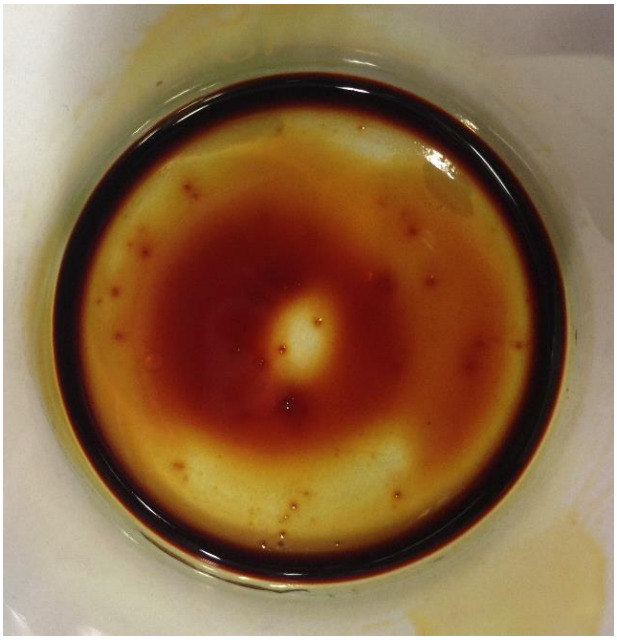
ภาพที่ 26 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลท K8–10 NRST15 และ NRST17

6. การศึกษาสารทุติยภูมิของเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลงโดยวิธี LCMS

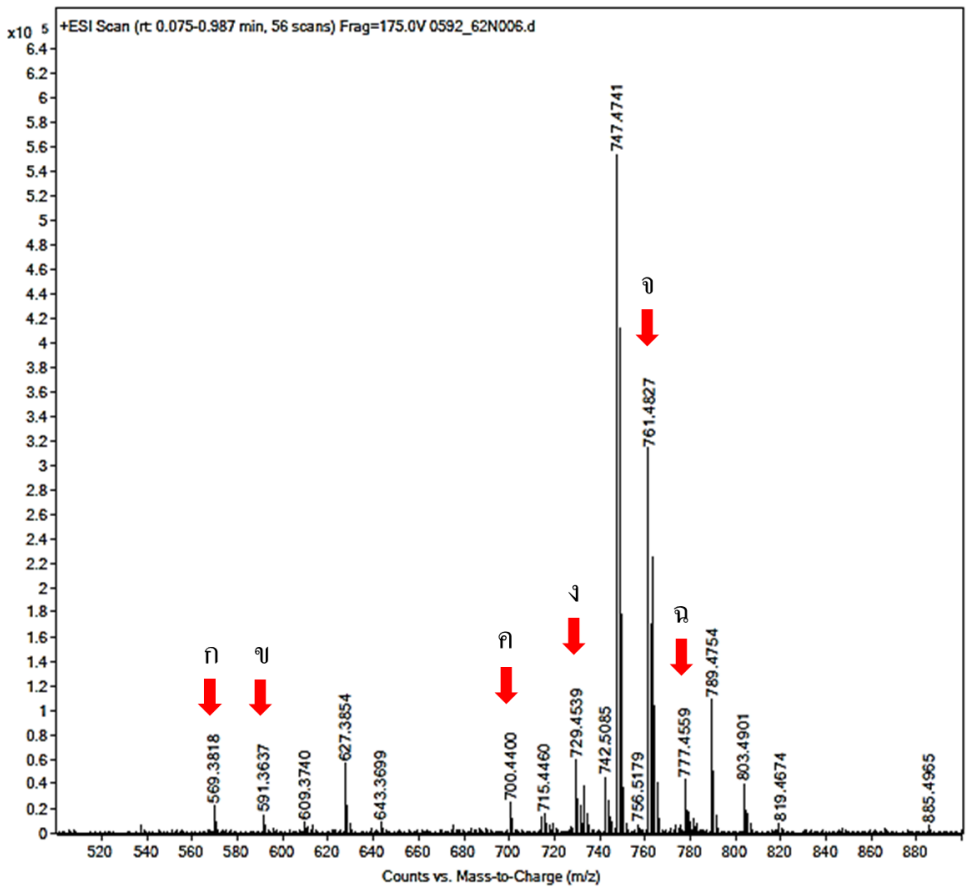
จากการสกัดสารทุติยภูมิของเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่ออกฤทธิ์ฆ่าแมลง โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMB เป็นระยะเวลา 14 วัน จำนวน 5 ลิตร ทำการสกัดแยกสารทุติยภูมิด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) และนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ได้สารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 จำนวน 3.612 กรัม สารสกัดหยาบมีลักษณะหนืดกึ่งแข็ง สีน้ำตาลแดง มีกลิ่นฉุน (ภาพที่ 27)

ผลการวิเคราะห์สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. hygroscopicus* K8–10 โดยวิธี LCMS เพื่อศึกษาชนิดของสารทุติยภูมิ พบว่าสารสกัดดังกล่าวแสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารหลายชนิด (ภาพที่ 28) โดยพบโมเลกุลของสารที่น่าสนใจ ซึ่งมีน้ำหนักมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับสารทุติยภูมิที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* spp. และออกฤทธิ์ควบคุมแมลง ได้แก่ มวลโมเลกุลที่มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) เท่ากับ 609.3740 m/z มีความใกล้เคียงกับสาร allosamidin ที่เชื้อ *Streptomyces* sp. สร้างขึ้นออกฤทธิ์ยั้งการสร้างเอนไซม์ไคติเนส ส่งผลต่อการเจริญเปลี่ยนแปลงรูปร่างในแมลง (Sakuda *et al*., 1987) มวลโมเลกุล 700 .4400 m/z มีความใกล้เคียงกับสาร moxidectin ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่เชื้อ *S. cyaneogriseus* สร้างขึ้น (Pricha *et al*., 2012) มีการนำมาใช้กำจัดเรือด ซึ่งเป็นปรสิตภายนอกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก (Zha *et al*., 2017) และไส้เดือนฝอย (Ayaz and Sahin, 2003**)** มวลโมเลกุล 729.4539 m/z มีความใกล้เคียงกับสาร avermectin มีรายงานพบในเชื้อ *S. avermitilis* ออกฤทธิ์ฆ่าแมลงศัตรูพืช ไร และไส้เดือนฝอย (Putter *et al*., 1981; Gianelli *et al*., 2000) โดยสารดังกล่าวออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทบริเวณ γ–aminobutyric acid (GABA) ส่งผลต่อการรับส่งกระแสประสาทที่จุดเชื่อมต่อกล้ามเนื้อ ทำให้คลอไรด์ไอออนมีการเคลื่อนย้ายผ่านเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดอาการอัมพาตและตายในที่สุด (Buckingham *et al*., 2005) มวลโมเลกุล 591.3637 m/z และ 761.4827 m/z มีความใกล้เคียงกับสารในกลุ่ม spinosyn A และ spinosyn Q ซึ่งมีรายงานในเชื้อ *S. albus* (Song *et al*., 2019) และ *S. spinosa* (Jha *et al*., 2013) ซึ่งมีรายงานการนำมาใช้ควบคุมแมลงหลายชนิด เช่น ลูกน้ำยุง (Raghavendra and Velamuri, 2018) แมลงสาบอเมริกัน แมลงวันบ้าน (Salgado, 1998) แมลงวันผลไม้ *B. zonata* และ *C. capitata* (Gazit and Akiva, 2017) มวลโมเลกุล 777.4559 m/z มีความใกล้เคียงกับสาร prasinon A & B ที่เชื้อ *S. prasinus* สร้างขึ้น และมีการนำมาใช้ควบคุมหนอนแมลงวันหัวเขียว (Box *et al*., 1973) เป็นต้น ในส่วนของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้เป็นสายพันธุ์ *S. hygroscopicus* พบว่ามีการรายงานการสร้างสารทุติยภูมิ

หลายชนิด เช่น ออกฤทธิ์ควบคุมแมลงจากเชื้อ *S. hygroscopicus* ได้แก่ milbemycin และ milbemycin oxime ซึ่งมีรายงานออกฤทธิ์ฆ่าหนอนผีเสื้อกลางคืน (gypsy moth) (Deecher *et al*., 1990) ไร (Kodandaram *et al*., 2010) และหมัด *Ctenocephalides felis* (Drydan *et al*., 2013) เป็นต้น อีกทั้งในกลุ่มสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ควบคุมวัชพืช ได้แก่ สาร hydantocidin (Nakajima *et al*., 1991) สารปฏิชีวนะต่อต้านแบคทีเรีย ได้แก่ hygromycin สารต่อต้านเชื้อรา gopalamycin (Kim and Hwang, 2007) เป็นต้น



ภาพที่ 27 ลักษณะของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10



ภาพที่ 28 LCMS chromatograph ของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10

(ก) มวลโมเลกุล 591.3637 m/z มีความใกล้เคียงกับสาร spinosyn A

(ข) มวลโมเลกุล 609.3740 m/z มีความใกล้เคียงกับสาร allosamidin

(ค) มวลโมเลกุล 700.4400 m/z มีความใกล้เคียงกับสาร moxidectin

(ง) มวลโมเลกุล 729.4539 m/z มีความใกล้เคียงกับสาร avermectin

(จ) มวลโมเลกุล 761.4827 m/z มีความใกล้เคียงกับสาร spinosyn Q

(ฉ) มวลโมเลกุล 777.4559 m/z มีความใกล้เคียงกับสาร prasinon A & B

7. การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. K8–10 ต่อแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะต่างๆ

ระยะไข่

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบเชื้อ *Streptomyces* sp. K8–10 ที่ระดับความเข้มข้นความเข้มข้น 50, 30 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี 1% DMSO ในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่าสารสกัดหยาบสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการฟักในระยะไข่ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* พบความผิดปกติได้ตั้งแต่ระยะไข่ และส่งผลให้มีความผิดปกติในระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย (ภาพที่ 29) โดยสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การฟักลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพสูงสุดส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์ การฟัก 53.00 ± 2.11 และสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การฟัก 65.17 ± 2.15 แตกต่างจากระดับความเข้มข้นอื่นๆและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่ส่งผลต่อการฟัก โดยมีเปอร์เซ็นต์การฟัก 73.33 ± 1.31 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากชุดควบคุม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การฟัก 76.67 ± 1.26 และสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลต่อการมีชีวิตรอดและความผิดปกติหลังจากการฟัก โดยกรรมวิธีที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลต่อความผิดปกติในแต่ละวัยและการมีชีวิตรอดของแมลงวันผลไม้ลดลงสูงสุด แตกต่างจากความเข้มข้นอื่นๆและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบการตายในวัยหนอน 11.67 ± 2.28 เปอร์เซ็นต์ สามารถพัฒนาเข้าดักแด้ได้ 41.33 ± 1.31 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักดักแด้เฉลี่ย 13.45 ± 0.23 มิลลิกรัม และมีชีวิตรอดเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์เพียง 36.17 ± 0.53 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการตายในวัยหนอน 6.67 ± 0.76 เปอร์เซ็นต์ สามารถพัฒนาเข้าดักแด้ได้ 58.50 ± 2.09 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักดักแด้เฉลี่ย 13.89 ± 0.08 มิลลิกรัม และมีชีวิตรอดเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ 53.50 ± 0.85 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสัดส่วนเพศและระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแต่ละวัยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

(ตารางที่ 8) จากรายงานการศึกษาเชื้อ *S. enissocaesilis* ไอโซเลท S12–17 พบว่าสารสกัดหยาบที่แยกสารด้วยเอททิลอะซิเตทและเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm มีความสามารถในการยับยั้งการฟักของไข่ยุง *Culex quinquefasciatus* ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และ 89 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Ganesan *et al.*, 2018) สารสกัดหยาบจากเชื้อ *S. roseoverticillatus* CMU–MH021 ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml สามารถออกฤทธิ์ฆ่าไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* โดยส่งผลให้ระยะไข่ไส้เดือยฝอยรากปมมีเปอร์เซ็นต์การฟักเพียง 14.6 เปอร์เซ็นต์ และออกฤทธิ์ฆ่าตัวอ่อนระยะที่ 2 ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การตาย 69.2 เปอร์เซ็นต์ โดยจากการวิเคราะห์ชนิดสารทุติยภูมิ พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อ *S. roseoverticillatus* CMU–MH021 มีสาร fervenulin และสาร isocoumarin ซึ่งออกฤทธิ์ฆ่าไส้เดือนฝอย (nematicidal) (Ruanpanun *et al*., 2011)

ตารางที่ 8 ผลของสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ต่อการพัฒนาการแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะไข่–ตัวเต็มวัย (mean ± SE)

เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ[1/]			
	ชุดควบคุม	50 mg/ml	30 mg/ml	10 mg/ml
การฟัก	76.67 ± 1.26^{a}	53.00 ± 2.11^{c}	65.17 ± 2.15^{b}	73.33 ± 1.31^{a}
หนอนที่ตาย	5.67 ± 1.02^{b}	11.67 ± 2.28^{a}	6.67 ± 0.76^{ab}	3.50 ± 1.06^{b}
เข้าดักแด้	71.00 ± 1.71^{a}	41.33 ± 1.31^{c}	58.50 ± 2.09^{b}	69.83 ± 1.58^{a}
น้ำหนักดักแด้ (มิลลิกรัม)	14.15 ± 0. 15^{a}	13.45 ± 0.23^{b}	13.89 ± 0.08^{ab}	14.06 ± 0.17^{ab}
ดักแด้ที่ตาย	2.83 ± 1.17^{a}	4.67 ± 0.88^{a}	4.50 ± 0.89^{a}	3.50 ± 1.26^{a}
ลอกคราบไม่สมบูรณ์	0.17 ± 0.17^{a}	0.33 ± 0.21^{a}	0.17 ± 0.17^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
ตัวเต็มวัยปกติ	68.00 ± 0.70^{a}	36.17 ± 0.53^{c}	53.50 ± 0.85^{b}	66.33 ± 0.64^{a}
ตัวเต็มวัยผิดปกติ	0.00 ± 0.00^{a}	0.17 ± 0.17^{a}	0.33 ± 0.21^{a}	0.00 ± 0.00^{a}
เพศผู้	56.76 ± 2.42^{a}	53.11 ± 3.92^{a}	49.67 ± 2.83^{a}	42.12 ± 2.48^{a}
ระยะเวลาไข่–หนอน	2.20 ± 0.03^{a}	2.20 ± 0.01^{a}	2.19 ± 0.02^{a}	2.16 ± 0.03^{a}
ระยะเวลาหนอน–ดักแด้	7.88 ± 0.03^{a}	7.26 ± 0.05^{b}	7.81 ± 0.04^{a}	7.93 ± 0.06^{a}
ระยะเวลาดักแด้–ตัวเต็มวัย	10.13 ± 0.07^{a}	10.24 ± 0.07^{a}	10.23 ± 0.06^{a}	10.04 ± 0.04^{a}

[1/]ตัวอักษรที่แตกต่างภายในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's HSD test

ภาพที่ 29 ลักษณะความผิดปกติของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะไข่–ตัวเต็มวัย หลังจากทดสอบสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ตั้งแต่ระยะไข่

(ก) ลักษณะกลุ่มไข่ที่ทำการทดสอบสารสกัดหยาบ

(ข) ลักษณะไข่ที่มีการฟักเป็นวัยหนอน (เครื่องหมายลูกศรชี้ไข่ที่มีการฟักเป็นวัยหนอน)

(ค) ลักษณะหนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่ฟักออกจากไข่

(ง) หนอนที่ตายเนื่องจากสารสกัดหยาบ

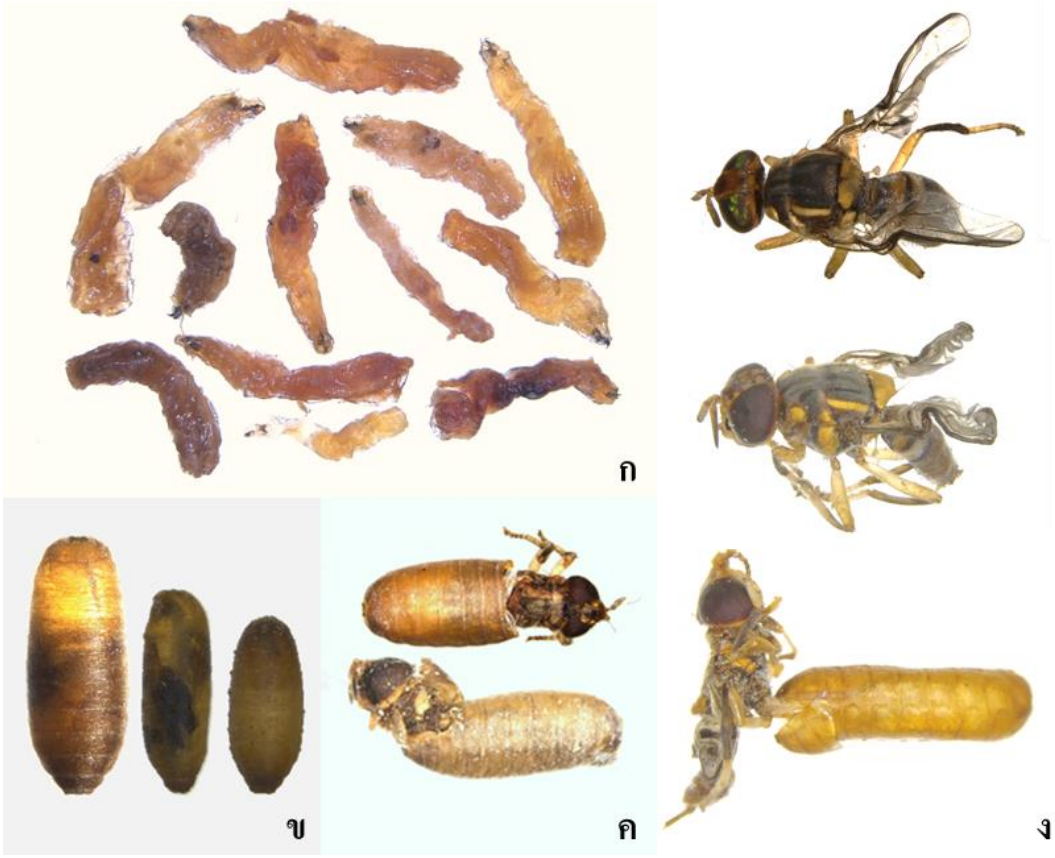
(จ) ลักษณะดักแด้ตายและมีขนาดเล็กแคระแกรน

(ฉ) ตัวเต็มวัยลอกคราบไม่สมบูรณ์

(ช) ตัวเต็มวัยที่มีความผิดปกติ

ระยะหนอน

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบเชื้อ *Streptomyces* sp. K8–10 ระยะหนอน สารสกัดหยาบทุกระดับความเข้มข้นออกฤทธิ์ฆ่าระยะหนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และส่งผลให้เกิดความผิดปกติในระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย (ภาพที่ 30) โดยที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ระยะหนอนมีเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด 68.00 ± 2.73 รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 30 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การตาย 58.67 ± 2.29 และ 40.67 ± 2.11 ตามลำดับ สำหรับตัวหนอนที่มีชีวิตรอดและเข้าสู่ระยะดักแด้ พบว่าสารสกัดหยาบเชื้อ *Streptomyces* sp. K8–10 ในทุกระดับความเข้มข้นทำให้ดักแด้เล็กลง โดยที่ระดับความเข้ม 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การตายในระยะดักแด้สูงสุด 17.33 ± 2.62 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การตายในระยะดักแด้ 12.00 ± 1.46 และ 9.67 ± 1.89 ตามลำดับ รวมทั้งส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเป็นตัวเต็มวัย โดยสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ตัวเต็มวัยสมบูรณ์เพียง 19.33 ± 3.25 รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้น 30 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ 22.00 ± 3.10 และ 46.67 ± 1.76 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ 95.33 ± 1.43 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับสัดส่วนเพศไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในระยะหนอนเข้าสู่ดักแด้ พบว่าหนอนที่ได้รับสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เข้าสู่ระยะดักแด้เร็วที่สุด โดยมีระยะเวลาจากระยะหนอนเข้าสู่ดักแด้ 7.62 ± 0.05 วัน ระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในระยะดักแด้เป็นตัวเต็มวัยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 9) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาน้ำเลี้ยงเชื้อ Actinobacteria จำนวน 12 ไอโซเลท ผ่านการสกัดโดยเทคนิค freeze dried เพื่อทดสอบการควบคุมแมลงวันผลไม้ *C. capitata* ในระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย พบว่าสารสกัดจากเชื้อ *S. phaeochromogenes* LD–37 ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การตายในระยะหนอนของแมลงวันผลไม้ *C. capitata* สูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ ในระยะดักแด้ 30 เปอร์เซ็นต์ และตัวเต็มวัย 28 เปอร์เซ็นต์ (Samri *et al*., 2016) รวมทั้งจากรายงานการศึกษา เชื้อ *Streptomyces* sp. KN–0647 ทำการสกัดด้วย ethyl acetate และแยกสาร โดยวิธีโครมาโทกราฟี (chromatographed) และวิเคราะห์ทางเคมีโดยวิธีสเปกโทรสโกปี (spectroscopic) พบสาร Guinomycin A ซึ่งมีคุณสมบัติฆ่าแมลงแบบไม่เฉพาะเจาะจงออกฤทธิ์ฆ่าหนอนวัยที่ 3 ของ *S. exigua*, *P. xylostella* และ *A. glycines* โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 83.9 µg/ml, 144.2 µg/ml และ 246.6 µg/ml ตามลำดับ รวมทั้งสามารถออกฤทธิ์ฆ่า *Dendrolimus punctatus* และ *C. pipiens* ได้อีกด้วย (Liu *et al*., 2008)



ภาพที่ 30 ลักษณะความผิดปกติของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะหนอน–ตัวเต็มวัย หลังจากทดสอบสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ตั้งแต่ระยะหนอน
(ก) หนอนที่ตายเนื่องจากสารสกัดหยาบ
(ข) ลักษณะดักแด้ตายและมีขนาดเล็กแคระแกรน
(ค) ตัวเต็มวัยลอกคราบไม่สมบูรณ์
(ง) ตัวเต็มวัยที่มีความผิดปกติ

ตารางที่ 9 ผลของสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ต่อการพัฒนาการแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะหนอน–ตัวเต็มวัย (mean ± SE)

เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ[1/]			
	ชุดควบคุม	50 mg/ml	30 mg/ml	10 mg/ml
หนอนตาย	2.00 ± 1.03^{d}	68.00 ± 2.73^{a}	58.67 ± 2.29^{b}	40.67 ± 2.11^{c}
เข้าดักแด้	98.00 ± 1.03^{a}	32.00 ± 2.73^{d}	41.33 ± 2.29^{c}	59.33 ± 2.11^{b}
น้ำหนักดักแด้ (มิลลิกรัม)	14.57 ± 0.19 ^{a}	13.55 ± 0.24 ^{b}	13.53± 0.23^{b}	13.72 ± 0.22^{ab}
ดักแด้ตาย	2.67 ± 1.23^{c}	9.67 ± 1.89^{bc}	17.33 ± 2.62^{a}	12.00 ± 1.46^{ab}
ลอกคราบไม่สมบูรณ์	0.00 ± 0.00^{b}	2.00 ± 0.73^{a}	0.67 ± 0.42^{ab}	0.33 ± 0.33^{ab}
ตัวเต็มวัยปกติ	95.33 ± 1.43^{a}	19.33 ± 3.25^{c}	22.00 ± 3.10^{c}	46.67 ± 1.76^{b}
ตัวเต็มวัยผิดปกติ	0.00 ± 0.00^{a}	1.00 ± 0.68^{a}	1.33 ± 0.67^{a}	0.33 ± 0.33^{a}
เพศผู้	52.81 ± 5.95^{a}	45.27 ± 6.05^{a}	61.13 ± 10.32^{a}	47.49 ± 4.53^{a}
ระยะเวลาหนอน–ดักแด้	7.89 ± 0.04^{a}	7.62 ± 0.05^{b}	7.74 ± 0.04^{ab}	7.88 ± 0.08^{a}
ระยะเวลาดักแด้–ตัวเต็มวัย	10.17 ± 0.07^{a}	10.17 ± 0.08^{a}	10.16 ± 0.14^{a}	10.14 ± 0.08^{a}

[1/]ตัวอักษรที่แตกต่างภายในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's HSD test

ระยะดักแด้

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบเชื้อ *Streptomyces* sp. K8–10 ที่ระดับความเข้มข้นความเข้มข้น 50, 30 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี 1% DMSO ในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ต่อแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะดักแด้ พบว่าสารสกัดหยาบทุกระดับความเข้มข้นไม่ส่งผลให้ระยะดักแด้เกิดความผิดปกติ และดักแด้สามารถพัฒนาเพื่อมีชีวิตรอดเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์มากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสัดส่วนเพศและระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในแต่ละวัยไม่มีความแตกต่าง โดยทุกระดับความเข้มข้นและชุดควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 10) สารสกัดหยาบไม่ออกฤทธิ์ฆ่าหรือส่งผลให้เกิดความผิดปกติในระยะดักแด้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Yamac และคณะ (2010) ทดสารสกัดหยาบจากเชื้อ *S. avermitilis* NRRL 8165 และ *S. pactum* NRRL 5230 โดยการหยดสารบนลำตัวแมลง (topical application) ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ในระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย พบว่าสารสกัดออกฤทธิ์ฆ่าระยะหนอน 95 เปอร์เซ็นต์ และฆ่าตัวเต็มวัย 75 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ส่งผลต่อระยะดักแด้ โดยดักแด้ที่ทดสอบฟักเป็นตัวเต็มวัยที่ปกติ อีกทั้งการทดสอบในครั้งนี้ใช้วิธีการแช่ดักแด้ในสารละลายสารสกัดหยาบ ในขณะที่หลายงานวิจัยมีรายงานการศึกษาการทดสอบสารออกฤทธิ์ที่ส่งผลต่อแมลง พบว่าส่วนใหญ่แมลงที่แสดงความผิดปกติหรือตาย เกิดจากการได้รับสารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยการกิน Samril และคณะ (2015) ทดสอบสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. OS46 และ *Streptomyces* sp. 37 และ *Streptomyces* sp. B62 โดยให้หนอนแมลงวัน *C. capitata* วัยที่ 1 ได้รับสารโดยการกิน พบว่าสารสกัดหยาบออกฤทธิ์ฆ่าวัยหนอนแมลงวันผลไม้ได้มีค่า LC50 เท่ากับ 0.26, 0.34 และ 0.84 $\mu g/mL^{-1}$ อีกทั้งโครงสร้างในระยะดักแด้ที่ผนังชั้นนอก (cuticle) มีความหนาและแข็งแรงเพื่อป้องกันตัวเองในขณะที่พักตัวภายในดักแด้ก่อนที่จะลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย ช่วยปกป้องแมลงการได้รับสารพิษหรืออันตรายจากปัจจัยอื่นๆ(Stehr, 2009)

ตารางที่ 10 ผลของสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 ต่อการพัฒนาการแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะดักแด้–ตัวเต็มวัย (mean ± SE)

เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ[1/]			
	ชุดควบคุม	50 mg/ml	30 mg/ml	10 mg/ml
ดักแด้ที่ตาย	2.00 ± 0.89[a]	1.67 ± 0.95[a]	2.00 ± 0.89[a]	1.33 ± 0.84[a]
ลอกคราบไม่สมบูรณ์	0.00 ± 0.00[a]	0.33 ± 0.33[a]	0.00 ± 0.00[a]	0.00 ± 0.00[a]
ตัวเต็มวัยปกติ	97.67 ± 0.80[a]	98.00 ± 1.03[a]	97.67 ± 1.09[a]	98.67 ± 0.84[a]
ตัวเต็มวัยผิดปกติ	0.33 ± 0.33[a]	0.00 ± 0.00[a]	0.33 ± 0.33[a]	0.00 ± 0.00[a]
เพศผู้	55.21 ± 3.20[a]	53.47 ± 2.83[a]	55.30 ± 2.76[a]	51.01 ± 4.34[a]
ระยะเวลาดักแด้–ตัวเต็มวัย	10.15 ± 0.09[a]	10.11 ± 0.09[a]	9.87 ± 0.07[a]	9.98 ± 0.09[a]

[1/]ตัวอักษรที่แตกต่างภายในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's HSD test

ระยะตัวเต็มวัย

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบเชื้อ *Streptomyces* sp. K8–10 ที่ระดับความเข้มข้นความเข้มข้น 50, 30 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี1% DMSO ในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ต่อแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะตัวเต็มวัย พบว่าสารสกัดหยาบเชื้อ *Streptomyces* sp. K8–10 สามารถออกฤทธิ์ฆ่าตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ได้ ทุกระดับความเข้มข้นที่ทำการศึกษาออกฤทธิ์ฆ่าระยะตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้ไม่แตกต่างกัน โดยที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของตัวเต็มวัยสูงสุด 28.33 ± 1.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 30 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของตัวเต็มวัย 20.83 ± 3.27 และ 18.33 ± 3.07 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 15 วัน แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการทดสอบสาร spinosad ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Saccharopolyspora spinosa* ซึ่งเป็นเชื้อในอันดับ Actinomycetales ที่สามารถออกฤทธิ์ในตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ของสาร spinosad สามารถ

ส่งผลให้เกิดการตายในระยะตัวเต็มวัยของแมลงวัน *Zeugodacus cucurbitae* 94.6 เปอร์เซ็นต์ *Dacus demmerezi* 85.7 เปอร์เซ็นต์ และ *D. ciliatus* 60.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Deguine *et al.,* 2012) อีกทั้งการศึกษาสาร abamectin ซึ่งเกิดจากการผสมสาร avermectin B1a กับ avermectin B1b ที่ผลิตจาก *S. avermitilis* อัตราการใช้ 1 มิลลิกรัม ผสม mineral oil 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถออกฤทธิ์ฆ่าตัวเต็มวัยแมลงหวี่ขาว *Bemisia tabaci* ให้มีเปอร์การตายสูงถึง 93–100 เปอร์เซ็นต์ (Kumar *et al*., 2007)

ตารางที่ 11 ผลของสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* sp.ไอโซเลท K8–10 ต่อการตายของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ระยะตัวเต็มวัย (mean ± SE)

เปอร์เซ็นต์การตาย	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ[1/]			
	ชุดควบคุม	50 mg/ml	30 mg/ml	10 mg/ml
เพศผู้	1.67 ± 1.05^{b}	15.83 ± 2.01^{a}	10.00 ± 2.24^{ab}	8.33 ± 2.79^{ab}
เพศเมีย	3.33 ± 1.67^{b}	12.50 ± 1.71^{a}	10.83 ± 3.27^{ab}	10.00 ± 1.29^{ab}
รวม	5.00 ± 1.83^{b}	28.33 ± 1.67^{a}	20.83 ± 3.27^{a}	18.33 ± 3.07^{a}

[1/]ตัวอักษรที่แตกต่างภายในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's HSD test

บทที่ 4
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการคัดกรองเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 52 ไอโซเลท พบเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงโดยวิธี brine shrimp bioassay สามารถฆ่าอาร์ทีเมียให้ตายมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยการรอดชีวิต (AST) อยู่ระหว่าง 11.3–17.4 ชั่วโมง น้อยกว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลทอื่นๆ และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.05)

การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส ซึ่งเป็นที่เกี่ยวข้องกับการฆ่าแมลง พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลงทั้ง 10 ไอโซเลท สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ ส่วนความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ทุกไอโซเลทที่ทำการศึกษาสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ ยกเว้นไอโซเลท K6–5 ไม่พบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส

ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในอาหารเหลว GYMB ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 9 ไอโซเลท (ไอโซเลท K6–5 ตรวจพบอยู่ในกลุ่มก่อโรคในมนุษย์จึงไม่นำมาทดสอบต่อ) พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. K5–4, K8–4, NRST9, NRST15 และ NRST17 เหมาะสำหรับการเลี้ยงที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 เหมาะสำหรับการเลี้ยงที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์ และเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลทK4H–9, K4H–10 และ K5H–10 เหมาะสำหรับการเลี้ยงที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ โดยที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่เหมาะสม เชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 9 ไอโซเลทสามารถออกฤทธิ์ฆ่าอาร์ทีเมียได้ 100 เปอร์เซ็นต์

การคัดกรองน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ส่งผลต่อการเจริญของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* พบว่าไอโซเลท K8–10, NRST15 และ NRST17ทำให้มีการตายและเกิดความผิดปกติ ส่งผลให้มีการรอดชีวิตเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ลดลง เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K 8–10 ส่งผลให้เกิดความผิดปกติและมีการตายสูงสุด หนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์เพียง 60.38 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ NRST17 และ NRST15 มีค่าเท่ากับ 73.33 และ 77.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ลักษณะสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางอณูวิทยา เชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ K8–10, NRST15 และ NRST17 ที่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าระยะหนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จำแนกได้เป็นเชื้อ *S. hygroscopicus* สำหรับไอโซเลท K8–10 และ *S. albidoflavus* สำหรับไอโซเลท NRST15 และ NRST17

การวิเคราะห์สารทุติยภูมิจากสารสกัดหยาบของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 โดยวิธี LCMS พบมวลโมเลกุลของสารหลายชนิด ที่ออกฤทธิ์ควบคุมแมลงได้แก่ มวลโมเลกุลที่มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) เท่ากับ 609.3740 m/z, 700 .4400 m/z, 729.4539 m/z 591.3637 m/z และ 761.4827 m/z มีความใกล้เคียงกับสาร allosamidin, moxidectin, avermectin spinosyn A และ spinosyn Q ตามลำดับ

การศึกษาสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. K8–10 ที่ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้น 50, 30 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะไข่ ระยะหนอน ระยะดักแด้และตัวเต็มวัย สารสกัดหยาบสามารถออกฤทธิ์ต่อแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้ในระยะไข่ ระยะหนอน และตัวเต็มวัย แต่ไม่ส่งผลต่อการทดสอบในระยะดักแด้

ระยะไข่ สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพยับยั้งการฟัก โดยมีเปอร์เซ็นต์การฟัก 53.00 และ 65.17 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่งผลต่อความผิดปกติในระยะหนอน ดักแด้ และทำให้มีการรอดชีวิตเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์เพียง 36.17 และ 53.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ระยะหนอน สารสกัดหยาบทุกระดับความเข้มข้นออกฤทธิ์ฆ่าระยะหนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และส่งผลให้เกิดความผิดปกติในระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย โดยที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ระยะหนอนมีเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด 68.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 30 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การตาย 58.67 และ 40.67 เปอร์เซ็นต์ มีชีวิตรอดเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ 19.33, 22.00 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ระยะดักแด้ สารสกัดหยาบเชื้อ *Streptomyces* sp. K8–10 ทุกระดับความเข้มข้นไม่ส่งผลต่อระยะดักแด้ ส่วนระยะตัวเต็มวัย ทุกระดับความเข้มข้นที่ทำการศึกษาออกฤทธิ์ฆ่าระยะตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* โดยที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของตัวเต็มวัยสูงสุด 28.33 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นสรุปได้ว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท K8–10 มีประสิทธิภาพควบคุมแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้ประโยชน์จากเชื้อจุลินทรีย์ควบคุมแมลง และน่าสนใจสำหรับนำไปศึกษาเพิ่มเติมและประยุกต์ใช้ควบคุมแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆหรือแมลงชนิดที่แตกต่างออกไป เป็นแนวทางสำหรับลดการใช้สารเคมีควบคุมแมลง เพื่อการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูที่ยั่งยืนในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ปรารถนา อัตตะมณี วสันณ์ เพชรรัตน์ และเสมอใจ ชื่นจิตต์. 2557. ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces philanthi* ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราของใบ ถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Fruw.) โดยชีววิธี. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1: 72–76.

มนตรี จิรสุรัตน์. 2544. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ แมลงวันผลไม้. เอกสารวิชาการเรื่องแมลงวัน ผลไม้ในประเทศไทย. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพมหานคร. หน้า 7–13.

วณิช ลิ่มโอภาสมณี ทศพล แทนนรินทร์ ฐิติมา คงรัตน์อาภรณ์ และ สุชาดา เสกสรรค์วิริยะ. 2555. การควบคุมแมลงวันผลไม้ในสวนพุทรานมสดโดยการใช้แมลงที่เป็นหมัน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 43: 425–428.

วารุณี ตันติธนากรกุล. 2551. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp. สายพันธ์ 442, 449 และ O145702. วิทยานิพนธ์วิทยาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 121 หน้า.

แสน ติกวัฒนานนท์. 2529. การเลี้ยงแมลงวันทองในสกุลดาคัสสี่ให้ได้ปริมาณมากด้วยอาหารกึ่งเทียม. วารสารเกษตรศาสตร์ 20: 22–36

Agrawal, T. and Kotasthane, A.S. 2009. Chitinolytic assay of indigenous Trichoderma isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. Springer Plus 1: 73.

Ait Barka, E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau–Vaillant, N., Jacquard, C., Meier–Kolthoff, J.P., Klenk, H.P., Clément, C., Ouhdouch, Y. and Van Wezele, G.P. 2016. Correction for Barka et al., taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 80: 1–43

Allwood, A.J. and LeBlanc, L. 1997. Losses caused by fruit flies in seven Pacific island countries. In: Allwood, A.J. and Drew, R.A.I., ed., Management of fruit flies in the Pacific. Canberra, ACIAR Proceedings No. 76: 208–211.

Allwood, A.J., Chinajariyawong, A., Drew, R.A.I., Hamacek, E.L., Hancock, D.L., Hengsawad, C., Jinapin, J.C., Jirasurat, M., Kong Krong, C., Kritsaneepaiboon, S., Leong, C.T.S. and Vijaysegaran, S. 1999. Host plant records for fruit flies (Diptera: Tephritidae) in South–East Asia. The Raffles Bulletin of Zoology Supplement 7. 92 pp.

Ando, K., Oishi, H., Hirano, S., Okutomi, T., Suzuki, K., Okazaki, H., Sawada, M. and Sagawa, T. 1971. Tetraranactin, a new miticidal antibiotic. I. Isolation, characterization and properties of tetranactin. Journal of Antibiotics 24: 347–352.

Anwar, S., Ali, B., Qamar, F. and. Sajid, I. 2014. Insecticidal activity of actinomycetes isolated from Salt Range, Pakistan against mosquitoes and red flour beetle. Pakistan Journal of Zoology 46: 83–92.

Arakawa, T. and Sugiyama, M. 2002. Promotion of nucleopolyhedrovirus infection in larvae of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) by an antibiotic, nikkomycin Z. Applied Entomology and Zoology 37: 393–397.

Arasu, M.V., Al–Dhabi, N.A., Saritha, V., Duraipandiyan, V., Muthukumar, C. and Kim, S.J. 2013. Antifeedant, larvicidal and growth inhibitory bioactivities of novel polyketide metabolite isolated from *Streptomyces* sp. AP–123 against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. BMC Microbiology 13: 105.

Box, S.J., Cole, M. and Yeoman, G.H. 1973. Prasinons A and B: potent insecticides from *Streptomyces prasinus*. Applied Microbiology 29: 699–704.

Buckingham, S.D., Biggin, P.C., Sattelle, B.M., Brown, L.A. and Sattelle, D.B. 2005. Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. Molecular Pharmacology 68: 942–51.

Burg, R.W., Miller, B.M., Baker, E.E., Birnbaum, J., Currie, S.A., Hartman, R., Kong, Y.L., Monaghan, R.L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J. B., Wallick, H., Stapley, E.O., Oiwa, R. and Omura, S. 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Producing organism and fermentation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 15: 361–367.

CABI and EPPO. 2016. *Bactrocera dorsalis* (Oriental fruit fly). : Systhematic review of the published literature. [online] Available from: www.eppo.int/QURANTINE/data_sheets/insects/DACUDO_ds.pdf. 30 July 2016.

CABI. 2016. *Bactrocera dorsalis* (Oriental fruit fly): Systhematic review of the published literature. [online] Available from: www.cabi.org/isc/datasheet/17685. 30 June 2016.

Carter, G.T., Schlingmann, G., Kenion, G.B., Milne, L., Alluri, M.R., Korshalla, J.D., Williams, D.R., Pinho, F. and Borders, D.B. 1994. Martinomycin, a new polyether antibiotic

produced by *Streptomyces salvialis*. II. Isolation and structure determination. Journal of Antibiotics 47: 1549–1553.

Castillo, M.A., Felis, N., Arago, P., Cuesta, G. and Sabater, C. 2006. Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. International Biodeterioration and Biodegradation 58: 196–202.

Choudhary, B., Nagpure, A. and Gupta, R.K. 2015. Antagonist *Streptomyces exfoliatus* MT9 as biocontrol agent against fruit–rotting fungi. Journal of Biotechnology and Biomaterial 5: 2.

Christenson, L.D. and Foote, R.H. 1960. Biology of Fruit Flies. Annual Review of Entomology 5: 171–192.

Clarke, A.R., Allwood, A.J., Chinajariyawong, A., Drew, R.A.I., Hengsawad, C., Jirasurat M., Kong Krong, C., Kristsaneepaiboon, S. and Vijaysegaran, S. 2001. Seasonal abundance and host use patterns of seven *Bactrocera* Macquart species (Diptera: Tephritidae) in Thailand and Peninsular Malaysia. The Raffles Bulletin of Zoology 49: 207–220.

Clarke, A.R., Armstrong, K.F., Carmichael, A.E., Milne, J.R., Raghu, S., Roderick, G.K. and Yeates, D.K. 2005. Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: the *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies. Annual Review of Entomology 50: 293–319.

Coombs, J.T. and Franco, C.M.M. 2003. Isolation and identification of actinobacteria from surface sterilized wheat root. Applied and Environmental Microbiology 69: 5603–5608.

Craveri, R. and Giolitti, G.An. 1957. Antibiotic with fungicidal and insecticidal activity produced by *Streptomyces*. Nature 179: 1307.

Dahiya, N., Tawari, R. and Sigh, G.H. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. Applied Microbiology and Biotechnology 71: 773–782.

Deguine, J.P., Douraguia, E., Atiama–Nurbel, T., Chiroleu, F. and Quilici, S. 2012. Cage study of spinosad–based bait efficacy on *Bactrocera cucurbitae*, *Dacus ciliatus*, and *Dacus demmerezi* (Diptera: Tephritidae) in Reunion Island. Journal of Economic Entomology 105: 1358–1365.

Diamantidis, A.D., Carey, J.R. and Papadopoulus, N.T. 2008. Life– history of an invasive tephritid. Department of Agriculture, Crop Production and Rural Environmental, University of Thessaly, Phytokou St. N, Ionia 38446, Magnisias, Greece.

Dieter, A., Hamm, A., Fiedler, H.P., Goodfellow, m., Muller, W.E.G., Brun, R., Beil, W. and Bringmann, G. 2003. Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic and antitumor compound produce by a novel alkalophilic *Streptomyces* strain. The Journal of Antibiotics 56: 639–646.

El–Bendary, M.A., Rifaat, H.M. and Keera, A.A. 2010. Larvicidal activity of extracellular secondary metabolites of *Streptomyces microflavus* against *Culex pipiens*. Canadian Journal of Pure and Applied Sciences 4: 1021–1026.

El–Gammal, E.W., Shalaby, H.A., Ashry, H.M. and El–Diwany, A.I. 2014. In vitro action of *Streptomyces griseolus* proteases as bio–control on Fasciola gigantic eggs. Journal of Bacteriology and Parasitology 5: 1000192.

Florencio, G., Couri, S. and Farinas, C.S. 2012. Correlation between agar plate screening and solid state fermentation for the prediction of cellulose production by Trichoderma strains. Enzyme Research 2012 doi:10.1155/2012/793708.

Gadelhak, G.G., El–tarabily, K.A. and Al–kaabi, F.K. 2005. Insect control using chitinolytic soil actinomycetes as bio–control agents. International Journal of Agriculture and Biology 7(4): 627–633.

Ganesan, P., Anand, S., Sivanandhan, S., David, R.H A., Paulraj, M.G., Al–Dhabi, N.A. and Ignacimuthu, S. 2018. Larvicidal, ovicidal and repellent activities of *Streptomyces enissocaesilis* (S12–17) isolated from Western Ghats of Tamil Nadu, India. Journal of Entomology and Zoology Studies 6: 1828–1835.

Harrison, R.L. and Bonning. B.C. 2010. Proteases as insecticidal agents. Toxins (Basel) 2: 935–953.

Heisey, R.M., Huang, J., Mishra, S.K., Keller, J.E., Miller, J.R., Putnam, A.R. and D'Silva, T.D.J. 1988. Production of valinomycin, an insecticidal antibiotic, by *Streptomyces griseus* var. flexipertum var. nov. Journal of Agriculture and Food Chemistry 36: 1283–1286.

Huamei, L., Sheng, Q.F., Yongxia, W., Wenjun, L. and Jie, Z. 2008. Insecticidal action of Quinomycin A from *Streptomyces* sp. KN–0647 isolated from a forest soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24: 2243–2248.

Izaguirre, G. and Taylor, W.D. 2004. A guide to geosmin– and MIB–producing cyanobacteria in the United States. Water Science and Technology 49: 19–24.

Janaki, T. 2016. Larvicidal activity of *Streptomyces cacaoi* subsp. cacaoi–M20 against *Culex quinquefasciatus* (III Instar). International Journal of Mosquito Research 3: 47–51.

Jizba J., Samoukina, G.V., Ivanova–Kovacheva, T., Kovacheva, T. and Kadybin, N.V. 1992. Insecticidal activity of pyrrolizine derivatives isolated from *Streptomyces griseus*. Folia Microbiologica 37: 461–462.

Jonsbu, E., McIntyre, M., and Neilson, J. 2002. The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. Journal of Biotechnology 95: 133–144.

Kämpfer, P. 2012. Genus *Streptomyces*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki KI, Ludwig W, Whitman WB (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 5, 2nd edn. The Actinobacteria, Part B. Springer, New York, pp. 1455–1767.

Kaur, T. and Manhas, R.K. 2013. Antifungal, insecticidal, and plant growth promoting potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16. Journal of Basic and Microbiology 54: 1175–1185.

Kaur, T., Vasudev, A., Sohal, S. and Manhas, R.K. 2014. Insecticidal and growth inhibitory potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16 on major pest of India, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). BMC Microbiology 14: 227.

Kido, G.S. and Spyhalski, E. 1950. Antimycin A, an antibiotic with insecticidal and miticidal properties. Science 112: 172–173.

Kumer, P. and Poehling, H.M. 2007 Effects of azadirachtin, abamectin, and spinosad on sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants under laboratory and greenhouse conditions in the humid tropics. Journal of Economic Entomology 100: 411–420.

Lane DJ. 1991. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. 16S/23S rRNA sequencing. In Goodfelloe M, Stackebrandt E (eds), John Wiley and Sons, Chichester, UK.

Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. International Journal of Systematic Bateriology 5: 435–443.

Lewer, P., Hahn, D.R., Karr, I.L., Graupner, P.R., Gilbert, J.R., 2003. A new family of insecticidal spinosyns from a novel *Saccharopolyspora* strain. Proceeding of the 44th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy 0:37.

Liu, H., Qin, S., Wang, Y., Li, W. and Zhang, J. 2008. Insecticidal action of Quinomycin A from *Streptomyces* sp. KN–0647, isolated from a forest soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24: 2243–2248.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P. 2009. In "Brock Biology of Microorganism" Twelfth edition. Pearson, Benjamin Cummings, Pearson Education, Inc.

Mar, T.T. and Lumyong, S. 2012. Evaluation of effective entomopathogenic fungi to fruit fly pupa, *Bactrocera* spp. and their antimicrobial activity. Chiang Mai Journal of Science 39: 464–477.

Mau, R.F.L., Sugano, J.S., Jang, E.B., Vargas, R.I. and Wong, L. 2006. Public and private partnerships in area wide fruit fly pest management for the benefit of farmers: the Hawaii experience. Proceedings of the International Symposium on Area–Wide Management of Insect Pests 19–29.

McCarthy, J.A. and Williams, T.S. 1990. Methods for studying the ecology of actinomycetes. In R Grigorova and JR Norris (Eds.) Method in Microbiology, pp. 535. London: Academic Press Limited.

Muller, H., Further, R., Zahner, H. and Rast, D.M. 1981. Effect of nikkomycin Z, nikkomycin X and polyoxin A on chitosomal chitin synthetase. Archives of Microbiology 13: 195–197

Nair, M.G., Chandra, A. and Thorogood, D.L. 1993. Griseulin, a new nitro–containing bioactive metabolite produced by *Streptomyces* spp. Journal of Antibiotics 46: 1762–1763.

Oishi, H., Sugawa, T., Okutomi, T., Suzuki, K., Hayashi, T., Sawada, M. and Ando, K. 1970. Insecticidal activity of macrotetrolide antibiotics. Journal of Antibiotic 23: 105–106.

Ouyang, L., Tu, G.Q., Gao, Y.S. and Zhang, P.Z. 1996. Chinese patent 1,070,228

Pitterna, T., Cassayre, J., and Huter, O. 2009. New Ventures in the Chemistry of Avermectins. Bioorg. Journal of Medicinal Chemistry 17: 4085–4095.

Putter, I., Connell, J.G.M., Preiser, F.A., Haidri, A.A., Ristich, S.S. and Dybas, R.A. 1981. Avermectins: novel insecticides, acaricides and nematicides from a soil microorganism. Experientia 37: 963–964.

Rafieenia, R. 2013. Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in Streptomycetes. Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences 3: 810–821.

Ruanpanun, P., Laatsch, H., Tangchitsomkid, N. and Lumyong, S. 2011. Nematicidal activity of fervenulin isolated from a nematicidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU–MH021, on *Meloidogyne incognita*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 27: 1373–1380.

Saadoun, I., Momani, A., Malkawi, H., and Mohammad, M. 1999. Isolation, identification and analysis of antibacterial activity of soil streptomycetes isolates from north Jordan. Microbios 100: 41–46.

Sakr, H.H. 2007. Toxicity of *Streptomyces lavendulae* (streptomycetaceae) culture filtrate to *Spodoptera littoralis* (boisd.) Larvae (lepidoptera: noctuidae). Egyptian Journal Society of Experimental Biology 3: 197–202.

Samri, S.E., Baz, M., Ghalbane, I., El Messoussi, S., Zitouni, A., El Meziane, A. and Barakate, M. 2017. Insecticidal activity of a Moroccan strain of *Streptomyces phaeochromogenes* LD–37 on larvae, pupae and adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitate* (Diptera: Tephritidae). Bulletin of Entomological Research 107: 217–224.

Samri, S.E., Baz, M., Jamjari, A., Aboussaid, H., Messoussi, S.E., Meziane, A.E. and Barakate, M. 2015. Preliminary assessment of insecticidal activity of Moroccan actinobacteria isolates against mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). African Journal of Biotechnology 14: 859–866.

Sathya, A., Vijayabharathi, R., Srinivas, V. and Gopalakrishnan, S. Plant growth–promoting actinobacteria on chickpea seed mineral density: an upcoming complementary tool for sustainable biofortification strategy. 3 Biotech 6: 1–6.

Sette, L.D., de Oliveira, V.M. and Manfio, G.P. 2005. Isolation and characterization of alachlor–degrading actinomycetes from soil. Antonie van Leeuwenhoek 87: 81–89.

Shi, Y.F. 2000. Advances of insecticidical microorganisms. Plant Protection 26: 32–34.

Shia, Y.W., Zhangb, X. and Louc, K. 2013. Isolation, characterization, and insecticidal activity of an endophyte of drunken horse grass, *Achnatherum inebrians*. Journal of Insect Science 13: 1536–2442.

Singh, S. 2003. Effects of aqueous extract of neem seed kernel and azadirachtin on the fecundity, fertility and post–embryonic development of the melonfly, *Bactrocera cucurbitae* and the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). Journal of Applied Entomology 127: 540–547.

SPSS. 2001. SPSS for Windows 11. SPSS Inc., Chicago (IL) URL http://WWW.SPSS.COM

Stehr, F.W. 2009. Pupa and Puparium. Encyclopedia of Insects pp. 862–863.

Sujitwanit, A., Chunthong, P., Piluk, J., Tantithanagorngul, W., Tolieng, V., Palaga, T., Sangvanich, P., Petsom, A., and Pinphanichakarn, P. 2007. Screening for insecticide–producing Streptomyces isolates from Thai soil. The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology.

Sun, Y., Zhou, X., Liu, J., Bao, K., Zhang, G., Tu, G., Kieser, T. and Deng, Z., 2002. Printed in Great Britain '*Streptomyces nanchangensis*', a producer of the insecticidal polyether antibiotic nanchangmycin and the antiparasitic macrolide meilingmycin, contains multiple polyketide gene clusters. Microbiology 148: 361–371.

Sutantawong, M., Orankanok, W., Enkerlin, W.R., Wornoayporn, V. and Caceres, C. 2002. The sterile insect technique for control of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), in mango orchards in Ratchaburi Province, Thailand. Proceedings of 6th International Fruit fly Symposium, Stellenbosch, South Africa, 6–10 May 2002, pp. 223–232.

Swan, D.G., Rodriguez, A.M., Vilches, C. Mendez, C. and Salas, J.A. 1994. Characterization of a *Streptomyces antibioticus* gene encoding a type l polyketide synthase which has an unusual coding sequence. Molecular and General Genetics 242: 358–326.

Taddei, A., Rodriiguez, M.J., Marquez–Vilchez, E. and Castelli, C. 2006. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. From Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies l. Microbiological Research 161: 222–231.

Takahaski, N., Suzuki, A., Kimura, Y., Miyamoto, S., Tamura, S., Mitsui, T., Fukami, J. 1968. Isolation, structure and physiological activities of piericidin B, natural insecticide produced by a Streptomyces. Agricultural and Biological Chemistry 32: 1115–1122.

Takashima, M. and Sakai, H. 1960. A New Toxic Substance, Teleocidin, Produced by Streptomyces. Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan 24: 647–655.

Takiguchi, Y., Mishima, H., Okuda, M., Terao, M., Aoki, A. and Fukuda, R. 1980. Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: Fermentation, isolation and physico–chemical properties. Journal of Antibiotics 33: 1120–1127.

Tantithanagorngul, W., Sujitwanit, A., iluk, J., Tolieng, P.V., Petsom, A., Sangvanich, P. Palaga, T. Puthong, S., Thamchaipenet, A. and Pinphanichakarn. P. 2011. Screening for brine

shrimp Larvicidal activity of *Streptomyces* isolated from soil and anti–tumor activity of the active isolates. Aust. Journal of Basic and Applied Sciences 5: 15–22.

Thaochan, N. and Chandrapatya, A. 2016. The phenotypic and metabolic properties of *Metarhizium quizhouense* on *Corcyra cephalonica.* Mycosphere 7: 215–226.

Tomilova, O.G., Kryukov,V.Y., Duisembekov, B.A., Yaroslavtseva, O.N., Tyurin, M.V., Kryukova, N.A., Skorokhod, V., Dubovskiy, I.M. and Glupov, V.V. 2016. Immune–physiological aspects of synergy between avermectins and the entomopathogenic fungus Metarhizium robertsii in Colorado potato beetle larvae. Journal of Invertebrate Pathology 140: 8–15.

Tresner, H.D., Davies, M.C. and Backus, E.J. 1961. Electron microscopy of Streptomyces spore morphology and its role in species differentiation. Journal of Bacteriology 81: 70–80.

Tsuji, K., Kobayashi, M., Nagashima, K., Wakisaka, Y. and Koizumi, K. 1975. A new antifungal antibiotic, trichostatin. Journal of Antibiotics 14649–14691.

Turner, M.J. and Schaeffer, J.M. 1989. Mode of action of ivermectin. In Ivermectin and Abamectin. Cambell, W.C., Ed.; Springer–Verlag: New York, NY, USA pp. 73–88.

Urushibata, I., Isogai, A., Matsumoto, S. and Suzuki, A. 1993. Respirantin, a novel insecticidal cyclodepsipeptide from *Streptomyces*. The Journal of Antibiotics 46: 701–703.

Vargas, R.I., Leblanc, L., Harris, E.J. and Manoukis, N. 2012. Regional suppression of *Bactrocera* fruit flies (Diptera: Tephritidae) in the Pacific through biological control and prospects for future introductions into other areas of the world. Insects 3: 727–742.

Vargas, R.I., Pinero, J.C. and Leblanc, L. 2015. An overview of pest species of *Bactrocera* fruit flies (Diptera: Tephritidae) and the integration of biopesticides with other biological approaches for their management with a focus on the pacific region. Insects 6: 297–318.

Vargas, R.I.J.D., Stark, B.M. and Bull, R. 2005. Weathering trials of amulet cue–lure and methyl eugenol "attract and kill" stations with male melon flies and oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. Journal of Economic Entomology 98: 1551–1559.

Vijayabharathi, R., Kumari, B.R., Sathya, A., Srinivas, V., Abhishek, R., Sharma, H.C. and Gopalakrishnan, S. 2014. Biological activity of entomopathogenic actinomycetes against lepidopteran insects (Noctuidae: Lepidoptera). Canadian Journal of Plant Science 94: 759 –769.

Wang, X.J., Zhang, J., Wang, J.D., Huang, S.X., Chen, Y.H., Liu, C.X., and Xiang, W.S. 2011. Four new doramectin congeners with acaricidal and insecticidal activity from Streptomyces avermitilis NEAU1069. Chemistry and Biodiversity 8: 2117–2125.

Wang, Y., Zhang, Z.S., Ruan, J., Wang, Y.M., and Ali, S. 1999. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 23: 178–187.

Weems, H.V. Jr. and Heppner, J.B. 1999. Oriental fruit fly, *Bactrocera* (Dacus) *dorsalis* (Hendel) (Insecta: Diptera: Tephritidae). Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, and T.R. Fasulo, University of Florida. University of Florida Publication EENY– 083.

White, I.M. and Elson–Harris, M.M. 1992. Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics. Centre of Agriculture and Biosciences International (CAB) with Australian Centers for International Agricultural Research, Wallingford, UK. 601 pp.

Xiong, L.X., Li, J.Z. and Wang, H.L. 2005. *Streptomyces* from marine. Journal of Environmental Sciences 17: 123–125.

Xu, L., Liang, K., Duan, B., Yu, M., Meng, W., Wang, Q. and Yu, Q. 2016. A novel insecticidal peptide SLP1 produced by *Streptomyces laindensis* H008 against *Lipaphis erysimi*. Molecules 21: 1101.

Yamac, M., Kanbak, G., Zeytinoglu, M., Senturk, H., Bayramoglu, G., Dokumacioglu, A. and Griensven, L.V. 2010. Pancreas Protective Effect of button Mushroom agaricus bisporus (J.E. Lange) imbach (Agaricomycetidae) extract on rats with streptozotocin–induced dia betes. International Journal of Medicinal Mushrooms, 12: 379–389.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลง โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay

ไอโซเลท	สัปดาห์	เปอร์เซ็นต์การตาย (%) ± SE[1/]								
		0 ชม.	3 ชม.	6 ชม.	9 ชม.	12 ชม.	15 ชม.	18 hr.	21 ชม.	24 ชม.
K4H–9	1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.33 ± 2.89	8.89 ± 4.19	18.89 ± 5.09	21.67 ± 5.20	24.44 ± 6.31	24.44 ± 6.31
		Aa	Aa	Aa	Aa	Ba	Ba	Ba	Ba	Ba
	2	0.00 ± 0.00	3.33 ± 2.89	10.00 ± 5.00	16.67 ± 7.64	34.44 ± 7.52	51.11 ± 9.18	72.78 ± 6.25	87.22 ± 3.15	87.22 ± 3.15
		Ad	Ad	Ad	Acd	ABbcd	ABabc	Aab	Aa	Aa
	3	0.00 ± 0.00	3.70 ± 3.21	27.64 ± 9.28	45.58 ± 7.71	64.39 ± 8.18	87.18 ± 8.01	97.44 ± 2.22	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ac	Ac	Abc	Ab	Aab	Aa	Aa	Aa	Aa
	4	0.00 ± 0.00	11.36 ± 2.30	14.14 ± 2.18	37.37 ± 5.44	54.04 ± 5.58	88.13 ± 6.99	93.94 ± 5.25	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ad	Bd	Acd	Abc	ABb	Aa	Aa	Aa	Aa
K4H–10	1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	5.13 ± 4.44	5.13 ± 4.44	16.78 ± 7.34	31.93 ± 5.95	41.03 ± 8.10	46.15 ± 4.03	46.15 ± 4.03
		Ab	Ab	Ab	Ab	Aab	Bab	Ba	Ba	Ba
	2	0.00 ± 0.00	2.78 ± 2.41	5.56 ± 2.40	20.56 ± 6.25	38.89 ± 4.81	53.33 ± 5.07	67.22 ± 3.76	80.00 ± 4.33	85.56 ± 1.92
		Ae	Ae	Ae	Ade	Acd	ABbc	ABab	Aab	Aa
	3	0.00 ± 0.00	5.56 ± 4.81	18.01 ± 2.27	35.65 ± 3.18	43.59 ± 5.55	71.92 ± 7.91	94.87 ± 4.44	97.44 ± 2.22	100.00 ± 0.00
		Ad	Ad	Acd	Ac	Abc	Aab	Aa	Aa	Aa
	4	0.00 ± 0.00	8.33 ± 4.17	8.33 ± 4.16	19.44 ± 4.81	50.00 ± 7.22	75.00 ± 0.00	91.67 ± 4.17	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ac	Ac	Ac	Ac	Ab	Aab	Aa	Aa	Aa

[1/] ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างภายในคอลัมน์เดียวกันและตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's HSD test

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลง โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay

ไอโซเลท	สัปดาห์	เปอร์เซ็นต์การตาย (%) ± SE[1/]								
		0 ชม.	3 ชม.	6 ชม.	9 ชม.	12 ชม.	15 ชม.	18 hr.	21 ชม.	24 ชม.
K5H–10	1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	8.33 ± 7.21	22.22 ± 10.49	25.93 ± 7.65	37.04 ± 11.97	58.33 ± 11.02	62.04 ± 7.90	65.74 ± 4.88
		Ac	Ac	Abc	Aabc	Babc	Babc	Bab	Bab	Ba
	2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	8.89 ± 4.19	18.33 ± 5.46	26.67 ± 4.41	45.00 ± 6.82	76.11 ± 3.37	82.22 ± 0.96	91.67 ± 4.17
		Ac	Ac	Ac	Abc	Bbc	Bb	Ba	ABKa	Aa
	3	0.00 ± 0.00	5.34 ± 2.32	9.51 ± 1.30	20.89 ± 5.81	50.37 ± 8.32	73.56 ± 2.14	85.84 ± 2.66	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ad	Ad	Ad	Ad	ABc	ABbc	ABab	Aa	Aa
	4	0.00 ± 0.00	2.22 ± 1.92	14.44 ± 7.51	33.33 ± 2.89	62.22 ± 5.36	90.00 ± 5.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ad	Ad	Acd	Ac	Ab	Aa	Aa	Aa	Aa
K5–4	1	0.00 ± 0.00	3.33 ± 2.89	7.04 ± 3.05	19.83 ± 4.44	50.03 ± 4.35	76.23 ± 7.76	85.93 ± 6.12	89.63 ± 5.01	100.00 ± 0.00
		Ad	Ad	Ad	Acd	Abc	Aab	Aa	Aa	Aa
	2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	22.55 ± 3.15	27.89 ± 2.58	52.76 ± 6.03	75.10 ± 3.67	94.19 ± 2.52	97.22 ± 2.41	100.00 ± 0.00
		Ae	Ae	Ad	Ad	Ac	Ab	Aab	Aa	Aa
	3	0.00 ± 0.00	3.70 ± 3.21	12.79 ± 6.85	35.02 ± 4.35	54.55 ± 4.82	75.42 ± 8.78	96.97 ± 2.62	96.97± 2.62	100.00 ± 0.00
		Ae	Ade	Ade	Acd	Abc	Aab	Aa	Aa	Aa
	4	0.00 ± 0.00	16.03 ± 3.75	18.60 ± 1.71	39.08 ± 3.04	45.82 ± 4.06	56.07 ± 6.23	78.37 ± 2.98	96.97 ± 2.62	96.97 ± 2.62
		Ae	Ade	Ade	Acd	Ac	Abc	Aab	Aa	Aa

[1/] ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างภายในคอลัมน์เดียวกันและตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's HSD test

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลง โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay

ไอโซเลท	สัปดาห์	เปอร์เซ็นต์การตาย (%) ± SE[1/]								
		0 ชม.	3 ชม.	6 ชม.	9 ชม.	12 ชม.	15 ชม.	18 hr.	21 ชม.	24 ชม.
K8–4	1	0.00 ± 0.00	6.73 ± 2.96	21.55 ± 6.06	30.64 ± 3.72	54.55 ± 4.82	78.45 ± 6.07	96.97 ± 2.62	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ae	Ade	Ade	Acd	Abc	Aab	Aa	Aa	Aa
	2	0.00 ± 0.00	7.41 ± 6.42	11.85 ± 5.59	32.22 ± 0.96	52.96 ± 1.40	80.74 ± 3.90	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ad	Ad	Acd	Abc	Ab	Aa	Aa	Aa	Aa
	3	0.00 ± 0.00	5.93 ± 2.80	7.78 ± 4.19	25.56 ± 4.19	34.26 ± 4.88	72.59 ± 2.80	84.63 ± 4.94	95.56 ± 3.85	100.00 ± 0.00
		Ae	Ade	Ade	Acd	Ac	Ab	Aab	Aab	Aa
	4	0.00 ± 0.00	2.78 ± 2.41	2.78 ± 2.40	17.17 ± 8.34	41.52 ± 9.39	72.02 ± 5.84	85.30 ± 5.19	97.78 ± 1.92	97.78 ± 1.92
		Ad	Ad	Ad	Acd	Abc	Aab	Aa	Aa	Aa
K8–10	1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.75 ± 1.51	53.46 ± 5.45	65.30 ± 4.57	77.24 ± 1.01	83.53 ± 2.93	86.31 ± 3.73	86.31 ± 3.73
		Ac	Ac	Ac	ABb	ABab	Ba	Ba	Ba	Ba
	2	0.00 ± 0.00	9.06 ± 4.21	14.39 ± 6.46	65.91 ± 3.61	88.64 ± 2.30	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ac	Ac	Ac	Ab	Aba	Aa	Aa	Aa	Aa
	3	0.00 ± 0.00	3.03 ± 2.62	18.03 ± 4.06	60.96 ± 4.03	93.64 ± 2.76	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ad	Acd	Ac	Ab	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa
	4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	19.99 ± 5.35	61.42 ± 5.68	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ad	Ad	Ad	Bc	Bb	Aa	Aa	Aa	Aa

[1/] ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างภายในคอลัมน์เดียวกันและตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's HSD test

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลง โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay

ไอโซเลท	สัปดาห์	เปอร์เซ็นต์การตาย (%) ± SE[1/]								
		0 ชม.	3 ชม.	6 ชม.	9 ชม.	12 ชม.	15 ชม.	18 hr.	21 ชม.	24 ชม.
NRST9	1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.06 ± 5.24	30.20 ± 1.52	37.24 ± 4.46	60.77 ± 7.45	87.88 ± 10.50	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ae	Ae	Ade	Acde	Acd	Abc	Aab	Aa	Aa
	2	0.00 ± 0.00	3.33 ± 2.89	8.68 ± 0.59	23.03 ± 6.37	43.38 ± 2.98	70.17 ± 9.16	94.66 ± 2.32	97.22 ± 2.41	100.00 ± 0.00
		Ae	Ae	Ae	Ade	Acd	Abc	Aab	Aab	Aa
	3	0.00±0.00	3.70 ± 3.21	8.47 ± 3.750	30.16 ± 3.83	38.62 ± 2.52	71.16 ± 9.38	93.92 ± 2.82	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ae	Ade	Ade	Acd	Ac	Ab	Aab	Aa	Aa
	4	0.00±0.00	0.00 ± 0.00	12.56 ± 7.79	34.36 ± 6.99	58.72 ± 5.99	68.72 ± 13.98	97.44 ± 2.22	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ac	Ac	Ac	Abc	Aab	Aab	Aa	Aa	Aa
NRST15	1	0.00±0.00	4.44 ± 3.85	17.26 ± 6.01	31.97 ± 2.99	44.44 ± 7.51	84.10 ± 10.61	95.56 ± 3.85	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ac	Ac	Abc	Abc	Ab	Aa	Aa	Aa	Aa
	2	0.00±0.00	0.00 ± 0.00	17.59 ± 4.00	27.78 ± 4.81	47.22 ± 3.67	63.89 ± 6.05	88.89 ± 9.62	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ae	Ae	Ade	Ade	Acd	Abc	Aab	Aa	Aa
	3	0.00±0.00	5.13 ± 4.44	13.46 ± 6.30	32.81 ± 5.81	41.90 ± 7.61	71.39 ± 7.68	83.51 ± 4.01	97.44 ± 2.22	97.44 ± 2.22
		Ad	Ad	Acd	Acd	Abc	Aab	Aa	Aa	Aa
	4	0.00±0.00	5.59 ± 2.45	5.59 ± 2.44	22.84 ± 2.27	40.09 ± 2.38	56.41 ± 8.79	79.72 ± 3.11	93.94 ± 2.62	96.97 ± 2.62
		Ae	Ae	Ae	Ade	Acd	Abc	Aab	Aa	Aa

[1/] ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างภายในคอลัมน์เดียวกันและตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's HSD test

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลง โดยใช้เทคนิค brine shrimp bioassay

ไอโซเลท	สัปดาห์	เปอร์เซ็นต์การตาย (%) ± SE[1/]								
		0 ชม.	3 ชม.	6 ชม.	9 ชม.	12 ชม.	15 ชม.	18 hr.	21 ชม.	24 ชม.
NRST17	1	0.00±0.00	0.00 ± 0.00	21.55 ± 14.89	39.39 ± 12.40	52.86 ± 7.67	74.41 ± 12.54	87.21 ± 6.86	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ad	Ad	Acd	Abcd	Aabcd	Aabc	Aab	Aa	Aa
	2	0.00±0.00	2.22 ± 1.92	16.03 ± 4.07	38.89 ± 5.85	56.98 ± 4.59	95.56 ± 3.85	97.78 ± 1.92	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		Ac	Ac	Ac	Ab	Ab	Aa	Aa	Aa	Aa
	3	0.00±0.00	6.73 ± 2.96	25.80 ± 7.87	30.92 ± 3.48	46.02 ± 4.80	57.89 ± 5.53	82.08 ± 4.19	96.97 ± 2.62	96.97 ± 2.62
		Af	Aef	Adef	Acde	Acd	Abc	Aab	Aa	Aa
	4	0.00±0.00	2.38 ± 2.06	10.84 ± 2.09	36.45 ± 5.89	45.49 ± 10.68	66.04 ± 6.58	73.55 ± 2.85	84.58 ± 5.72	95.05 ± 2.15
		Ae	Ae	Ade	Acde	Abcd	Aabc	Aab	Aa	Aa

[1/] ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างภายในคอลัมน์เดียวกันและตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's HSD test

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวเบญจวรรณ ศิริกุล

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5810620057

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2558

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนโครงการเรียนดี คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนสนับสนุนการผลิตบัณฑิต สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

เบญจวรรณ ศิริกุล และ นริศ ท้าวจันทร์. 2560. การคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ท้องถิ่นที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง. วารสารแก่นเกษตร (ฉบับพิเศษ) 45 (1): 1366–1371.

เบญจวรรณ ศิริกุล และ นริศ ท้าวจันทร์. 2561. การสร้างเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสของเชื้อแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ท้องถิ่นที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง. วารสารแก่นเกษตร (ฉบับพิเศษ) 46 (1): 639–744.

นริศ ท้าวจันทร์ ยาวารีย๊ะห์ สาเมาะ เบญจวรรณ ศิริกุล คอฎีย๊ะ เถาวัลย์ และ รูเฟียะห์ มะลี. 2561. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับดักแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) รูปแบบต่างๆ ในสวนมะละกอ. วารสารแก่นเกษตร (ฉบับพิเศษ) 46 (1): 725–731.