การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี สำเร็จรูปเพื่อกำจัดหนอนกระทู้หอม
The Product Development of Nucleopolyhedrovirus formulations for Controlling Beet armyworm

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ อิศเรส เทียนทัด
รัตนา นชะพงษ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี สำเร็จรูปเพื่อกำจัดหนอนกระทู้หอม ได้ดำเนินการผลิตไวรัส เอ็นพีวี สูตรสำเร็จรูปชนิดสารละลายแขวนลอย โดยผสมสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆ แต่เนื่องจากเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) อยู่ระหว่างการซ่อมแซม ยังไม่สามารถใช้งานได้อย่างสมบูรณ์ จึงได้ปรับวิธีการผลิตเชื้อไวรัสในรูปผงด้วยการอบแห้งแบบธรรมดา ซึ่งปกติไม่สามารถนำมาใช้ในการอบแห้งจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เพราะอาจทำให้จุลินทรีย์เหล่านี้ตายได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาอุณภูมิที่ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมสามารถมีชีวิตอยู่ได้ ด้วยทดสอบการให้อุหภูมิด้วยตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส แก่ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม พบว่าไวรัสชนิดนี้สามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการผสมสารผสมชนิดต่างๆได้แก่ สารเพิ่มฤทธิ์ สารกระตุ้นการกินของหนอน และสารผสมอื่นๆ แล้วนำเข้าตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชม. แล้วนำไปบดละเอียด พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น 3.45 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้หอมไม่แตกต่างจากสูตรสำเร็จรูปเดิมชนิดน้ำที่แนะนำอยู่ในปัจจุบัน

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-02-01-05-54

คำนำ

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี ทั้งสูตรสารแขวนลอยในน้ำและสูตรผงละลายน้ำ เป็นเป้าหมายหลักในการพัฒนาคุณภาพเชื้อไวรัสเพื่อการนำไปใช้ ไวรัส เอ็นพีวี ผลิตจากตัวหนอนซึ่งเป็นแมลงอาศัยโดยตรง ประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวี จะคงที่อยู่ได้นานเพียงใดอยู่ที่การทำสูตรสำเร็จ (formulation) ซึ่งในหลักการผลิตจุลินทรีย์นั้น จุลินทรีย์ที่ผลิตได้ควรเก็บไว้ได้นานเกินกว่า 12 เดือน (Hunter-Fujita et al.,1998) ดังนั้นการวิจัยเพื่อการทำสูตรสำเร็จเพื่อให้เก็บรักษาผลิตพันธุ์ไวรัส เอ็นพีวี ในสภาพอากาศร้อนในประเทศไทยจึงมีความสำคัญมากกว่าประเทศที่มีอากาศเย็น เช่น ในยุโรปและอเมริกา รูปแบบการทำสูตรสำเร็จที่เหมาะสมของแต่ละชนิดจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมมีส่วนสำคัญต่อการเก็บรักษาและต่อประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ (ทิพย์วดี, 2549) ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาสูตรสำเร็จสามารถนำไปใช้ได้จริงในแปลงเกษตรกรโดยประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชไม่ลดลงซึ่งการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในสภาพไร่จริง เพื่อเป็นข้อมูลชี้ให้เห็นว่าการพัฒนาสูตรสำเร็จไวรัส เอ็นพีวี สามารถเพิ่มศักยภาพในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชเมื่อเทียบกับสูตรดั่งเดิมที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

วิธีการ แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 การพัฒนากรรมวิธีการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

การศึกษากรรมวิธีการอบที่เหมาะสมด้วยความดันต่างๆคือ 1,000, 750, 500 และ 250 มิลลิทอร์ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีการอบแห้งด้วย Automatic Program วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) มี 3 ซ้ำ 5 กรรมวิธี โดยกำหนดอุณหภูมิสุดท้าย (Shelf temperature)เท่ากับ 20 องศาเซลเซียล และอุณหภูมิในการแช่แข็ง (Freezing temperature) เท่ากับ -30 องศาเซลเซียล โดยมีกรรมวิธี ดังนี้

(1) อบแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่ความดัน 1,000 mT
(2) อบแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่ความดัน 750 mT
(3) อบแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่ความดัน 500 mT
(4) อบแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่ความดัน 250 mT
(5) อบแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วย Automatic run

ขั้นตอนที่ 2 การพัฒนาสูตรผงสำเร็จรูปด้วยสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆ ได้แก่ สาร sticker เพื่อให้ไวรัสเกาะติดแน่นบนใบพืช ได้แก่ skim milk , สารhumectant ช่วยป้องกันไม่ให้น้ำที่เป็นตัวพาไวรัสไปสู่ใบพืชระเหยแห้งไปก่อน สารกลุ่มนี้ได้แก่ sorbital และ molasses เป็นต้น สาร feeding attractant ช่วยกระตุ้นการกินของหนอน เช่น soy flour และน้ำตาล sucrose เป็นต้น โดยหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผสมส่วนผสมทั้งหมดนี้ด้วยวิธี Mixture design และทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี Bioassay กับหนอนกระทู้หอมวัย 3 จำนวน 30 ตัวต่อกรรมวิธี

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาคุณลักษณะสูตรสำเร็จรูปของชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็น พี วี หนอนกระทู้หอม ทั้งรูปสารละลายแขวนลอยเปรียบเทียบกับรูปผง ในบรรจุภัณฑ์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ซองอลูมิเนียมฟอยด์ ขวดพลาสติกสีชาและขวดพลาสติกทึบสีขาว

3.1 เตรียมไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม ชนิดสารละลายแขวนลอยปริมาณ 300 มล. และชนิดผงปริมาณ 300 กรัม แบ่งใส่ขวดพลาสติกทึบสีขาวขวดละ 50 มล.และ 50 กรัม จำนวนประเภทละ 6 ขวด รวม 12 ขวดหรือซองแล้วนำไวรัส เอ็นพีวี ทั้งสองประเภทอย่างละครึ่งไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 5±2 องศาเซลเซียส และอีกครึ่งที่เหลือนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 29±2 องศาเซลเซียส

3.2 นำผลิตภัณฑ์ทั้งสองสูตรทั้งที่เก็บในตู้เย็นและเก็บที่อุณหภูมิห้องชนิดละ 1 ขวด มาตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ทุกเดือน เป็นเวลา 6 เดือน คุณภาพที่ตรวจได้แก่ การตรวจนับผลึกใต้กล้องจุลทรรศน์ ความเป็นกรด-ด่าง จุลินทรีย์ปนเปื้อนชนิดต่างๆ และการทดสอบการตายของหนอนกระทู้หอมวัยที่ 3 จำนวน 30 ตัวต่อสูตร

3.3 การตรวจสอบคุณภาพชีวผลิตภัณฑ์ชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็น พี วี หนอนกระทู้หอม

3.3.1 การตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพ

- เปอร์เซ็นต์ความชื้น
- ความสามารถในการละลายน้ำ

3.3.2 การตรวจสอบคุณภาพทางเคมี (A.O.A.C, 1995)

- ความเป็นกรด-ด่าง

3.3.3 การตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์ (A.O.A.C, 1995)

- ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด
- ยีสต์และรา

ขั้นตอนที่ 4 การศึกษาอายุการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์โดยวิธีเร่งสภาวะ (Accelerated Shelf-Life Testing; ASLT)

ศึกษาและทำนายอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ โดยนำชีวผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป บรรจุในขวดที่ผ่านการทดสอบแล้ว ขวดละ 50 กรัม เก็บใน 2 สภาวะคือ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิเร่ง โดยเก็บผลิตภัณฑ์ในตู้บ่ม พร้อมกับเก็บผลิตภัณฑ์ที่สภาวะควบคุม คือ 5 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นตัวอ้างอิง นำผลิตภัณฑ์ที่เก็บแต่ละสภาวะที่อุณหภูมิเร่งมาตรวจสอบคุณภาพทุกสัปดาห์ คุณภาพที่ตรวจสอบดังนี้ คุณภาพทางกายภาพได้แก่ ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น คุณภาพทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง และคุณภาพทางจุลินทรีย์ ได้แก่ จุลินทรีย์ปนเปื้อนต่างๆ ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา ส่วนการวัดค่าคุณภาพหรือประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ ใช้ทดสอบด้วยวิธี Bioassy กับหนอนกระทู้หอมวัย 3 จำนวน 50 ตัวต่อกรรมวิธี เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนในแต่ละระยะที่ทดสอบ แล้วจึงนำระยะเวลาดังกล่าวมาทำนายอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิที่ต้องการตามวิธีของ ASLT

การบันทึกข้อมูล

- บันทึก น.น. ก่อนอบและหลังอบไวรัส เอ็นพีวี ของแต่ละกรรมวิธี
- บันทึกเวลาในการอบและวัดค่าคุณภาพต่างๆ ได้แก่ ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง ความสามารถในการละลาย และปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนชนิดต่างๆ
- เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจากการทดสอบในขั้นตอนต่างๆ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา : ตุลาคม 2553 – กันยายน 2558

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการอาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี สำเร็จรูปเพื่อกำจัดหนอนกระทู้หอม ได้ดำเนินการผลิตไวรัส เอ็นพีวี สูตรสำเร็จรูปชนิดสารละลายแขวนลอย โดยผสมสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆ แต่เนื่องจากเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) อยู่ระหว่างการซ่อมแซม ยังไม่สามารถใช้งานได้อย่างสมบูรณ์ จึงได้ปรับวิธีการผลิตเชื้อไวรัส

ในรูปผงด้วยการอบแห้งแบบธรรมดา ซึ่งปกติไม่สามารถนำมาใช้ในการอบแห้งจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เพราะอาจทำให้จุลินทรีย์เหล่านี้ตายได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาอุณภูมิที่ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมสามารถมีชีวิตอยู่ได้ ด้วยทดสอบการให้อุหภูมิด้วยตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส แก่ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม พบว่าไวรัสชนิดนี้สามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการผสมสารผสมชนิดต่างๆ ได้แก่ สารเพิ่มฤทธิ์ สารกระตุ้นการกินของหนอน และสารผสมอื่นๆ แล้วนำเข้าตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชม. แล้วนำไปบดละเอียด พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น 3.45 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้หอมไม่แตกต่างจากสูตรสำเร็จรูปเดิมชนิดน้ำที่แนะนำอยู่ในปัจจุบัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ตายหนอนกระทู้หอมที่ทดสอบด้วยไวรัสเอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมชนิดต่างๆ

กรรมวิธี	อัตรา (มล.ต่อ 20 ลิตร)	เปอร์เซ็นต์หนอนตาย 1/		เฉลี่ย
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
1. SeNPV สูตรผง	30	96.01 a 2/	100	98.0
2. SeNPV สูตรน้ำมัน	30	96.01 a	100	98.0
3. SeNPV (BIO V1)	30	100 a	100	100
4. SeNPV เชื้อสด	30	92.01 a	100	96.0
5. control	-	0 b	0	0
C.V. (%)		5.79	-	-

1/ เปอร์เซ็นต์การตายที่ปรับค่าด้วย corrected mortality

2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งในแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ด้วยวิธี DMRT

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การผลิตเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม ด้วยวิธีอบแห้งด้วยลมร้อนแบบธรรมดา โดยควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 60 องศา สามารถผลิตชีวผลิตภัณฑ์ชนิดผงที่มีคุณภาพไม่แตกต่างจากการอบด้วยเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แต่มีต้นทุนที่ต่ำกว่าและยังคงมีประสิทธิภาพสูงไม่แตกต่างกัน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณส่วนบริหารโครงการวิจัย ที่ได้จัดสรรงบซ่อมแซมจากกรมวิชาการเกษตร ในการซ่อมเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

เอกสารอ้างอิง

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549. ไวรัสของแมลงนิวคลีโอโพลิฮีโดรไวรัส. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพมหานคร. 395 หน้า.

Hunter-Fujita, Philip, F. E., Hugh, F. E. and Norman, E. C. 1998. Insect Viruses and Pest Management. John Wiley & Sons Ltd. England. 620 pp.