การมีชีวิตรอดของสปอร์เชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่ผลิตได้จากกากตะกอนดีแคนเตอร์และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน

Viability of *Beauveria bassiana* Spores Produced from Decanter Cake and Biohydrogen Effluent under Different Temperature Storage

วนิดา เพ็ชร์ลมุล

Wanida Petlamul

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา วิทยาเขตสตูล

Songkhla Rajabhat University (Saton Campus)

Received : 9 June 2015

Accepted : 23 December 2015

Published online : 1 February 2016

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่ผลิตภายใต้สภาวะที่เหมาะสมบนอาหารแข็งโดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์ และอาหารเหลวโดยใช้น้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4±2 และ 30±2 °C เพื่อประเมินการมีชีวิตรอดจากเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ภายในห้องปฏิบัติการ ทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 0-90 วัน ผลการศึกษาพบว่า เชื้อรา *B. bassiana* ที่ผลิตจากอาหารแข็งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 °C มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงจาก 76.10% เหลือ 34.50% (ลดลงเฉลี่ย 0.46 % ต่อวัน) และสปอร์ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30±2 °C มีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลงจาก 76.20% เหลือ 32.00% (ลดลงเฉลี่ย 0.49 % ต่อวัน) สำหรับสปอร์ของเชื้อราที่ผลิตจากอาหารเหลวและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 °C พบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงจาก 75.50 % เหลือ 31.00 % (ลดลงเฉลี่ย 0.49 % ต่อวัน) และสปอร์ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30±2 °C มีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลงจาก 74.50 % เหลือ 27.00 % (ลดลงเฉลี่ย 0.53 % ต่อวัน) ซึ่งชี้ให้เห็นว่า เชื้อราที่เลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 °C พบการมีชีวิตรอดมากกว่าในสภาวะอาหารเหลวที่อุณหภูมิสูงกว่า (30±2 °C) คิดเป็น 1.15 เท่า

คำสำคัญ: กากตะกอนดีแคนเตอร์ การมีชีวิตรอด เชื้อราบิวเวอเรีย น้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน อายุการเก็บรักษา

***Corresponding author. E-mail:** wanipet@hotmail.com

Abstract

Beauveria bassiana produced from solid medium using the optimized decanter cake and liquid medium using biohydrogen effluent was stored under temperature of 4±2 and 30±2 ^{0}C to evaluate its viability based on spore germination percentage (SGP) in the laboratory interval 10 days for 90 days. The findings showed that *B. bassiana* produced from solid medium and stored under temperature of 4±2 ^{0}C gave the SGP reduction from 76.10 % to 34.50 % (average reduction: 0.46 % per day) while these spores which were stored under temperature of 30±2 ^{0}C gave the SGP reduction from 76.20 % to 32.00 % (average reduction: 0.49 % per day). In addition, *B. bassiana* produced from liquid medium using biohydrogen effluent was stored under temperature of 4±2 ^{0}C gave the SGP reduction from 75.50 % to 31.00 % (average reduction: 0.49 % per day) and its storage under 30±2 ^{0}C gave the SGP reduction 74.50 % to 27.00 % (average reduction: 0.53 % per day). This result indicated that *B. bassiana* which was produced from solid medium and stored under temperature of 4±2 ^{0}C exhibited higher fungal viability than produced from liquid medium and stored under temperature of 30±2 ^{0}C by 1.15 folds.

Keywords: decanter cake, viability, *Beauveria bassiana*, biohydrogen effluent, storage

บทนำ

การใช้สารเคมีทางการเกษตรส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกร และผู้บริโภคสินค้าเกษตรที่มีสารเคมีตกค้าง รวมทั้งเกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Kruawal *et al*., 2005) ซึ่งสารเคมีทางการเกษตรนับเป็นสาเหตุของมะเร็ง เนื้องอก การเจริญของเซลล์ที่ผิดปกติ และการตายของเซลล์สืบพันธุ์ เป็นต้น (Thai-PAN, 2011) การควบคุมศัตรูพืชแบบชีววิธีโดยการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมแมลงจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มความปลอดภัยต่อเกษตรกร และลดปัญหาสารเคมีตกค้างทางการเกษตรดังที่กล่าวมา สำหรับเชื้อรา *Beauveria bassiana* เป็นเชื้อราแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงได้หลายชนิด ได้แก่ แมลงในอันดับ Lepidoptera (Godonou *et al*., 2009; Amer *et al.,* 2008; Petlamul & Prasertsan, 2012) Diptera (Lohmeyer & Miller, 2006) Heteroptera (Kivan, 2007) และ Hymenopterta (Al-mazra'awi, 2007) เป็นต้น ทำให้เชื้อราชนิดนี้ได้รับการสนับสนุนจากหลายหน่วยงานให้ใช้ในทางการเกษตร อย่างไรก็ตาม การผลิตและเพิ่มปริมาณเชื้อราชนิดนี้ยังคงมีต้นทุนในการผลิตเนื่องจากใช้วัตถุดิบจากธัญพืชต่าง ๆ เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง เป็นต้น ดังนั้นการผลิตเชื้อรา *B. bassiana* ให้มีปริมาณมากพอที่จะแจกจ่ายเกษตรกร โดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่มีต้นทุนต่ำเป็นวัตถุดิบในการผลิตนับเป็นการส่งเสริมการใช้เชื้อรา *B. bassiana* ทางการเกษตรอีกทางหนึ่ง สำหรับอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันเป็นอุตสาหกรรมที่เติบโตมากในภาคใต้และมีแนวโน้มจะเติบโตสูงขึ้น มีวัสดุเศษเหลือปริมาณสูงถึง 70 % ได้แก่ กากตะกอนดีแคนเตอร์ น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และอื่น ๆ (Juntaraniyom, 2008) กากตะกอนดีแคนเตอร์มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของธาตุอาหารต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ได้ดังนี้ คาร์บอน (45.0-55.2 %) ไนโตรเจน (2.2-2.8 %) ฟอสฟอรัส (0.4-1.4 %) โพแทสเซียม (0.8-2.5 %) แมกนีเซียม (0.3-2.0 %) และแคลเซียม (0.3-2.0 %) จึงเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญของเชื้อราได้ (Haron *et al*., 2008, Ubon *et al*. 2007, Yahya *et al*., 2010, Razak *et al*., 2012, Petlamul & Prasertsan, 2014a) สำหรับน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจนที่ได้จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน จำเป็นต้องบำบัดก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ เนื่องจากมีสารอินทรีย์เกินระดับมาตรฐาน โดยองค์ประกอบของสารอินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันระเหยง่ายชนิดต่าง ๆ เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิค กรดบิวทาริก ในปริมาณ 6,788

2,350 และ 14,247 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำตาล รวมทั้งมีแอมโมเนีย 2,348 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารอื่น ๆ ที่เชื้อรา สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อการเจริญได้ (Xing *et al*., 2008) โดยมีรายงานว่า เชื้อรา *B. bassiana* สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตสปอร์ได้ 4.80×10^{8} สปอร์ต่อกรัม ในกากตะกอนดีแคนเตอร์ที่เติมยูเรีย เปปโตน และแมกนีเซียมซัลเฟต ในปริมาณ 0.80 2.10 และ 0.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Petlamul & Prasertsan, 2014a) และในกรณีที่เลี้ยงด้วยน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจนที่เติมโพแทสเซียมไนเตรต ยีสต์สกัด และแคลเซียมคลอไรด์ในปริมาณ 3.60 4.55 และ 0.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตสปอร์ได้ 4.46×10^{8} สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Petlamul & Prasertsan, 2014b) อย่างไรก็ตาม หลังจากได้กระบวนการผลิตเชื้อรา *B. bassiana* ที่เหมาะสมแล้ว การศึกษาประสิทธิภาพการมีชีวิตรอดระหว่างการเก็บรักษาจะเป็นประโยชน์ให้กับผู้ใช้ผลิตภัณฑ์และการปรับปรุงกระบวนการเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา (Xian-Shi *et al*., 2004) ซึ่งการศึกษาการมีชีวิตรอดระหว่างการเก็บรักษาของเชื้อรา *B. bassiana* ยังไม่แพร่หลายมากนัก จึงจำเป็นต้องศึกษาเพื่อให้ทราบถึงความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อราดังกล่าว ดังนั้น งานวิจัยชิ้นนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการมีชีวิตรอดระหว่างการเก็บรักษา โดยการศึกษาประสิทธิภาพการงอกของสปอร์เชื้อรา *B. bassiana* ที่ผลิตได้จากกากตะกอนดีแคนเตอร์และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน เพื่อเป็นแนวทางการเก็บรักษาเชื้อราที่ผลิตได้ และสามารถเป็นต้นแบบให้กับการพัฒนาการผลิตเชื้อราแมลงชนิดอื่น ๆ ได้ นอกจากนี้ งานวิจัยนี้เป็นการลดปริมาณ และเพิ่มมูลค่าวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อเป็นการส่งเสริมและเผยแพร่การใช้เชื้อรา *B. bassiana* สำหรับทำการเกษตรอินทรีย์ที่ลดต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกรได้

วิธีการวิจัย

เชื้อรา B. bassiana และการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

เชื้อรา *B. bassiana* BNBCRC จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการทำลายหนอนกระทู้ผัก (cutworm, *S. litura*) สูงสุด (80 %) และมีการงอกของสปอร์สูงสุด (72.22 %) หลังจากทดสอบในห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับเชื้อราแมลงอีก 9 สายพันธุ์ ตามการรายงานของ Petlamul & Prasertsan (2012) ดังนั้นเชื้อราสายพันธุ์นี้จึงถูกคัดเลือกมาศึกษาต่อ โดยนำเชื้อราดังกล่าวมาเลี้ยงด้วยอาหาร Czapex Dox Agar (CDA) ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 °C) เป็นเวลานาน 7 วัน หรือจนกว่าเชื้อจะเจริญสมบูรณ์ เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้นที่มีความเข้มข้น 1×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับใช้ในการทดลอง สำหรับหัวเชื้อราถูกเก็บรักษาบน PDA slant ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะใช้ และมีการถ่ายเชื้อใหม่ทุกเดือน (Soundarapandian & Chandra, 2007; Pham *et al.,* 2009)

กากตะกอนดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน

กากตะกอนดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน ถูกรวบรวมมาหลังจากได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของสารอาหารในการเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* BNBCRC ในกากตะกอนดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน ตามรายงานของ Petlamul & Prasertsan (2014a) และ Petlamul & Prasertsan (2014b) โดยองค์ประกอบทางเคมีแสดงได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของกากตะกอนดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน

ลักษณะทางเคมี	กากตะกอนดีแคนเตอร์ (เปอร์เซ็นต์)	น้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ไนโตรเจนทั้งหมด	2.27	11
คาร์บอนทั้งหมด	(Total Organic Carbon, TOC) 47	(Chemical Oxygen Demand, COD) 62,236
ฟอสฟอรัส	0.41	ND
โพแทสเซียม	0.88	ND
แมกนีเซียม	2.03	ND
คาร์บอน:ไนโตรเจน	20.70	56.58
กรดอะซิติก	ND	7,340
กรดบิวทาริก	ND	4,654
กรดโพรพานิก	ND	423
บิวทานอล	ND	108
เอทานอล	ND	572
น้ำตาลกลูโคส	ND	589
น้ำตาลไซโลส	ND	2,085
น้ำตาลอะราบิโนส	ND	657
pH	5.01	5.42

หมายเหตุ: ND คือ ไม่ได้ตรวจวัด

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Petlamul & Prasertsan (2014a) และ Petlamul & Prasertsan (2014b)

การเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

การเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในกากตะกอนดีแคนเตอร์

การเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* ในสภาวะอาหารแข็ง ดำเนินการภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามการรายงานของ Petlamul & Prasertsan (2014a) ดังนี้ เตรียมกากตะกอนดีแคนเตอร์ปริมาณ 50 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกขนาด 16×24 เซนติเมตร เติมยูเรีย เปปโตน และแมกนีเซียมซัลเฟต ที่อัตราความเข้มข้น 0.80 2.10 และ 0.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นปรับความชื้นให้ได้ 60 % ปิดปากถุงด้วยคอขวดและจุกสำลีก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากวัสดุเลี้ยงเชื้อผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลง ทำการปลูกเชื้อรา *B. bassiana* ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของสปอร์ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30±2 °C เป็นเวลา 12 วัน โดยเขย่าถุงเพาะเชื้อทุกวันเพื่อกระจายเชื้อ

การเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน

เตรียมน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมไนเตรต สารสกัดยีสต์ และแคลเซียมคลอไรด์ ที่อัตราความเข้มข้น 3.05 5.18 และ 0.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้วเย็นลง เติมเชื้อรา *B. bassiana* ที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มไว้ในอุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า 180 rpm เป็นเวลา 7 วัน (Petlamul & Prasertsan, 2015)

การเก็บรักษาเชื้อรา *B. bassiana* ที่เลี้ยงได้จากกากตะกอนดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน

เชื้อรา *B. bassiana* ที่เลี้ยงด้วยกากตะกอนดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในข้อ 3.2 ถูกนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4±2 และ 30±2 °C เป็นระยะเวลา 90 วัน เพื่อประเมินการมีชีวิตรอดระหว่างการเก็บรักษาจากการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ทุก ๆ 10 วัน

<u>การตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเชื้อรา *B. bassiana* ที่ผลิตได้จากกากตะกอนดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน</u>

สำหรับการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในกากตะกอนดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน ดำเนินการทุก ๆ 10 วัน เริ่มตั้งแต่ 0-90 วันของการเก็บรักษา โดยการสุ่มตัวอย่าง 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 กรัม (เชื้อราที่เลี้ยงด้วยกากตะกอนดีแคนเตอร์) และ 1 มิลลิลิตร (เชื้อราที่เลี้ยงด้วยน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน) นำตัวอย่างที่ได้มาเตรียมสปอร์แขวนลอยให้มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยดสปอร์แขวนลอย ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร PDA เกลี่ย spore suspension ให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยมที่ลนไฟ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30±2 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตัดชิ้นวุ้นขนาด 1×1 เซนติเมตร วางบนกระจกสไลด์ โดยหงายด้านที่มีสปอร์ขึ้น หยด lactophenol cotton blue ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปิดทับด้วย cover slip นับจำนวนสปอร์ที่งอก โดยสปอร์ที่งอกพิจารณาจากความยาวของ germ tube ต้องยาวมากกว่าขนาดความกว้างของสปอร์จากจำนวนทั้งหมด 300 สปอร์ นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การงอกโดยใช้สูตรตามสมการ (1) (ทำการทดลองซ้ำกัน 3 ชุด ๆ ละ 5 plates) และเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (เชื้อรา *B. bassiana* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมทั้งแบบอาหารแข็งและอาหารเหลวก่อนการเก็บรักษา) เพื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเชื้อราโดยใช้สูตร (Kassa *et al.*, 2008) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์} = \frac{(x-y)*100}{x} \quad (1)$$

$\mathbf{x}$ คือ ค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่มีการงอกบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดควบคุม (ก่อนการเก็บรักษา)

y คือ ค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่มีการงอกบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดทดสอบ (หลังการเก็บรักษา)

นำผลเปอร์เซ็นต์การงอกของเชื้อราที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4±2 และ 30±2 °C จากสมการที่ 1 ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และวิเคราะห์การถดถอยแบบไม่เชิงเส้น ที่อยู่ในรูปแบบพหุนาม (สมการที่ 2) เพื่อจะนำไปสู่การคาดการณ์หรือประมาณค่าเปอร์เซ็นต์การงอกที่อาจลดลงต่อไป

$$y = a_0 + a_1x + a_2x^2 + ... + a_nx^n \quad (2)$$

y คือ ตัวแปรตอบสนอง

$\mathbf{x}$ คือ ตัวแปรทำนาย

a_n คือ สัมประสิทธิ์อันดับที่ n

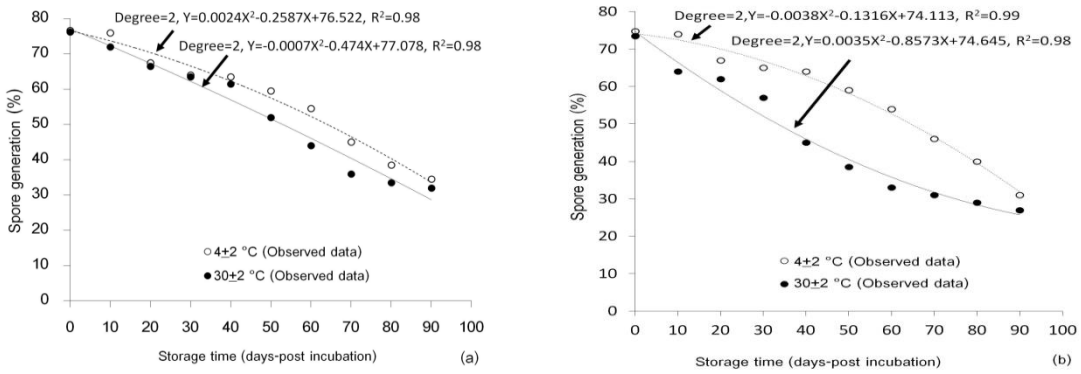
สำหรับลักษณะของเชื้อรา *B. bassiana* ที่ผลิตได้จากกากตะกอนดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 และ 30±2 °C ตรวจสอบโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (รุ่น Quanta400, FEI, Czech Republic)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การมีชีวิตรอดของสปอร์เชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่ผลิตได้จากกากตะกอนดีแคนเตอร์และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 และ 30±2 °C

การศึกษาการมีชีวิตรอดของสปอร์เชื้อราสามารถศึกษาได้จากเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ ซึ่งในการศึกษานี้ พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* BNBCRC ที่ผลิตได้จากกากตะกอนดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4±2 และ 30±2 °C เป็นระยะเวลา 90 วัน ยังมีชีวิตรอดในทั้งสองสภาวะ เนื่องจากพบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ในระหว่างเก็บรักษา แม้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงต่อเนื่องที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้นก็ตาม โดยเชื้อราที่ผลิตด้วยกากตะกอนดีแคนเตอร์พบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์สูงกว่าที่เลี้ยงด้วยน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน และการเก็บรักษาไว้ที่ 4±2 °C พบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ 76.1 % ในวันแรกของการเก็บรักษา และลดลงเหลือ 34.50 % ในวันที่ 90 ของการเก็บรักษา (ลดลงเฉลี่ย 0.46 % ต่อวัน) ขณะที่เมื่อเก็บรักษาไว้ที่ 30±2 °C พบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ 76.2 % ในวันแรกของการเก็บรักษา และลดลงเหลือ 32 % ในวันที่ 90 ของการเก็บรักษา (ลดลงเฉลี่ย 0.49 % ต่อวัน) (รูปที่ 1a) สำหรับเชื้อรา *B. bassiana* ที่ผลิตได้จากน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน และเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4±2 °C พบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ 75.5 % ในวันแรกของการเก็บรักษา ลดลงเหลือ 31 % ในวันที่ 90 ของการเก็บรักษา (ลดลงเฉลี่ย 0.49 % ต่อวัน) และเมื่อเก็บรักษาเชื้อราไว้ที่อุณหภูมิ 30±2 °C พบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ 74.5 % ในวันแรกของการเก็บรักษา และลดลงเหลือ 27 % ในวันที่ 90 ของการเก็บรักษา (ลดลงเฉลี่ย 0.53 % ต่อวัน) ลดลงเป็น 1.15 เท่าของเชื้อราที่ผลิตได้จากกากตะกอนดีแคนเตอร์และเก็บรักษาที่ 4±2 °C (รูปที่ 1b) โดยเฉพาะเมื่อพิจารณาวันที่ 40 ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30±2 °C จะเห็นได้ว่า เชื้อราที่เลี้ยงด้วยน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน พบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงอย่างรวดเร็วกว่าเชื้อราที่เลี้ยงด้วยกากตะกอนดีแคนเตอร์อย่างเห็นได้ชัด

จากผลการวิเคราะห์การถดถอยพบว่า สมการพหุนามอันดับที่ 2 สามารถใช้ประมาณค่าเปอร์เซ็นต์การงอกที่อาจลดลงได้ตามสมการทำนายในรูปที่ 2a-b ซึ่งการวิเคราะห์ตัวแปรทางสถิติจากการวิเคราะห์การถดถอยมีดังนี้ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.98 และ 0.99 มีค่าใกล้เคียง 1 ซึ่งสรุปได้ว่า การเก็บรักษาเชื้อราในแต่ละสภาวะที่นานขึ้นสามารถประมาณค่าเปอร์เซ็นต์การงอกที่ลดลงได้ 98 และ 99% ตามลำดับ ซึ่งค่าที่เหลืออีก 0.02 และ 0.01 % อาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่น เช่น สายพันธุ์จุลินทรีย์ ค่า water activity และค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Wakefield, 2006) เป็นต้น (ภาพที่ 1a-b)



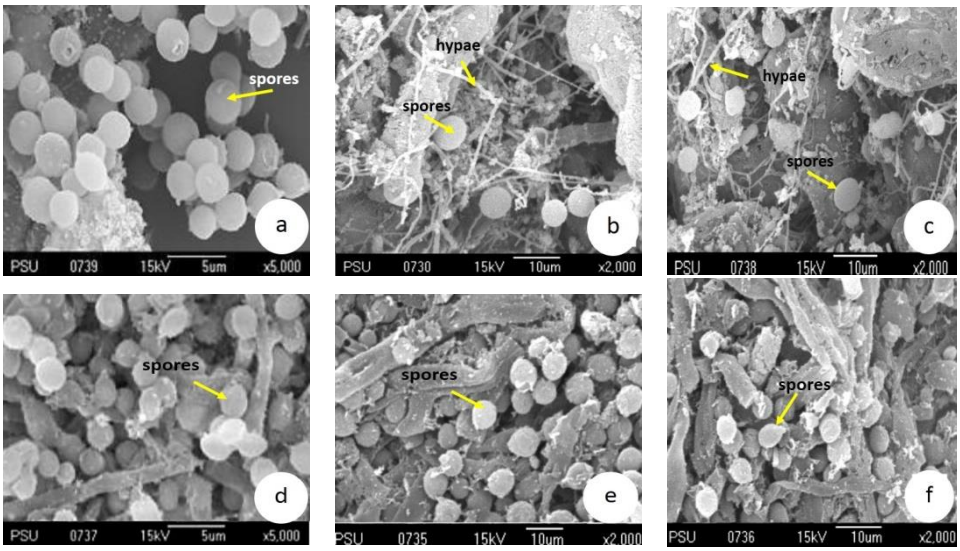
ภาพที่ 1 การมีชีวิตรอดของสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* BNBCRC ที่ผลิตได้จากกากตะกอนดีแคนเตอร์ (a) และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน (b) หลังจากเก็บรักษาที่ 4±2 และ 30±2 °C เป็นเวลา 90 วัน

จากผลการทดลอง ชี้ให้เห็นว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เชื้อรา โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอาจแตกต่างกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา ซึ่งโดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิที่ 25-30 °C เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* (Hong *et al*., 1997) สอดคล้องกับการทดลองของ Petlamul & Prasertsan (2014a) ที่พบว่าที่อุณหภูมิ30 °C เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* BNBCRC สำหรับอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษา มีรายงานว่าอุณหภูมิสูงส่งผลต่อการสูญเสียการมีชีวิตรอดรวดเร็วกว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (Blanford *et al*., 2012) โดยอุณหภูมิมีความสัมพันธ์กันกับปริมาณความชื้นในระบบที่ส่งผลต่อการงอกของสปอร์ และการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยเฉพาะระบบที่เลี้ยงแบบอาหารแข็งพบว่าที่อุณหภูมิสูงมีการเปลี่ยนแปลงมวลสารมากกว่า ทำให้อาหารแห้งเนื่องจากความชื้นในระบบลดลง (Magan, 2004) ซึ่งเคยมีรายงานว่า เชื้อรา *B. bassiana* ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้เลย เมื่อความชื้นในอาหารแข็งลดลงเหลือน้อยกว่า 5% (Hong, 2001) ในทำนองเดียวกัน อายุการเก็บรักษาของเชื้อรา *B. brongniartii* ที่ผลิตได้จากข้าวบาร์เลย์ พบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์และความเข้มข้นของสปอร์ลดลงหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2°C เป็นเวลา 24 วัน (Aregger, 1992) นอกจากนี้หลังจากที่เก็บรักษาเชื้อรา *B. bassiana* ในรูปเส้นใยอบแห้งภายใต้อุณหภูมิ 25 °C เป็นระยะเวลานานหนึ่งสัปดาห์แล้วนำมาทดสอบการสร้างสปอร์ พบว่า เชื้อราสร้างสปอร์ได้ในปริมาณต่ำ ขณะที่ไม่พบการสร้างสปอร์ของเชื้อราเลยเมื่อเก็บรักษาไว้ที่ 35 °C (Rombach *et al*.,1987) สำหรับเชื้อราแมลงสายพันธุ์อื่น *Metarhizium anisopliae* ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 33 °C พบว่า เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เมื่อเก็บเชื้อราไว้ที่ 4 °C มีปริมาณมากกว่าที่เก็บไว้ที่ 33 °C โดยที่อุณหภูมิ 33 ° C ไม่พบการเจริญ (Daoust and Roberts, 1983) อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่เชื้อรา *B. bassiana* ยังสามารถเจริญรอดได้หลังจากเก็บรักษานั้นเคยมีรายงานว่า เชื้อราสามารถสะสมน้ำตาลโพลิออลไว้ในระหว่างการเพิ่มปริมาณเซลล์ และเมื่อเชื้อราสามารถสะสมอาหารไว้ได้อย่างพอเหมาะจะสามารถงอกเป็นเส้นใยและสร้างสปอร์ได้ต่อไป (Kassa *et al*., 2008) ความสามารถของเชื้อราในการสะสมสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลกลูโคส ส่งผลให้การเก็บรักษาเชื้อรานั้น ๆ มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เนื่องจากคุณสมบัติดังกล่าวจะช่วยให้เชื้อรามีแหล่งคาร์บอนสำรองในการดำรงชีวิตแม้ในสภาวะที่ขาดแคลนอาหาร (Hegedus *et al*., 1990) นอกจากนี้ การเสริมแหล่งอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตในช่วงระหว่างการเก็บรักษาเชื้อรา จะเป็นวิธีการหนึ่งที่จะสามารถยืดอายุของเชื้อรา (Zabriskie *et al*., 1999) ด้วยเหตุผลนี้ส่งผลให้เชื้อรายังคงมีอาหารสะสมเพื่อการเจริญรอดได้อีก แม้กระทั่งสภาวะอาหารแห้งที่ยากต่อการดูดซึมสารอาหารมาใช้เพื่อการเจริญ

สำหรับวิธีการเก็บรักษาเชื้อราแมลงที่เหมาะสมต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อราในระหว่างการเก็บรักษา ได้แก่ การเก็บรักษาเชื้อราไว้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว การต่อเชื้อ (subculture) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5-8 °C (Borman *et al*., 2006) โดยเฉพาะการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเชื้อราไว้ได้นานขึ้น (Pasarell & McGinnis, 1992 นอกจากนี้เก็บรักษาเชื้อรา *B. bassiana* ไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมมีประโยชน์ในด้านการรักษาคุณสมบัติการงอกของสปอร์ และความรุนแรงในการทำลายแมลง (Chong-Rodríguez *et al*., 2011) และความสามารถในการผลิตสปอร์ของเชื้อราแมลงแต่ละสายพันธุ์ (Jackson, 1997)) ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่า สภาวะการเลี้ยงเชื้อรา และอุณหภูมิในการเก็บรักษาเชื้อรามีอิทธิพลต่อการมีชีวิตรอดของสปอร์เชื้อรา เนื่องจากเชื้อราที่เลี้ยงทั้งสองสภาวะหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำพบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์มากกว่าที่อุณหภูมิสูง

2. <u>ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ที่ผลิตได้จากกากตะกอนดีแคนเตอร์และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจนหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 และ 30±2 °C</u>

ลักษณะของเชื้อรา *B. bassiana* ที่ผลิตภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ 4±2 และ 30±2 °C นาน 90 วัน (ภาพที่ 2c-f) พบว่า โดยส่วนใหญ่สปอร์ของเชื้อรายังคงมีรูปร่างกลม ตามคุณลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* BNBCRC (Oliveira *et al*., 2011) และมีลักษณะสปอร์ที่ไม่แตกต่างกันกับเชื้อราที่ผลิตได้ก่อนการเก็บรักษา (ภาพที่ 2a-b)



ภาพที่ 2 Scanning electron micrograph ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* BNBCRC ที่ผลิตจากกากตะกอนดีแคนเตอร์ก่อนเก็บรักษา (a) หลังเก็บรักษาที่ 4±2 °C, 90 วัน (b) หลังเก็บรักษาที่ 30±2 °C, 90 วัน (c) และเชื้อราที่ผลิตจากน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจนก่อนเก็บรักษา (d) หลังเก็บรักษาที่ 4±2 °C, 90 วัน (e) และหลังเก็บรักษาที่ 30±2 °C, 90 วัน (f)

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อราแมลง *B. bassiana* ที่ผลิตได้จากกากตะกอนดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4±2 และ 30±2 °C เป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* ที่ผลิตจากอาหารแข็งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 °C พบการมีชีวิตรอดสูงสุด เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 0.46 % ต่อวัน แต่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30±2 °C พบการมีชีวิตรอดของสปอร์ไม่แตกต่างกับสปอร์ของเชื้อราที่ผลิตจากอาหารเหลวและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 °C โดยเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.49 % ต่อวัน ขณะที่เมื่อเก็บเชื้อราที่ผลิตจากอาหารเหลวและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30±2 °C พบการมีชีวิตรอดต่ำสุด เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.53 % ต่อวัน ซึ่งคิดเป็น 1.15 เท่า ของเชื้อรา *B. bassiana* ที่ผลิตจากอาหารแข็งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 °C อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษาเชื้อราชนิดนี้ในรูปอาหารเหลว สามารถทำได้แต่อาจต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาต่อไป ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกใช้เชื้อราแมลงที่เก็บรักษาในระยะเวลา และสภาวะที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการควบคุมศัตรูพืชในการเกษตร ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์การงอกของเชื้อรานอกจากจะแสดงการมีชีวิตรอดของสปอร์แล้ว แต่การงอกของสปอร์ยังบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของคุณสมบัติการเข้าทำลายแมลงได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือสำหรับการวิจัย จากมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ร่วมกับภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

Al-mazra'awi, M. S. (2007). Impact of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on the honey bee, *Apis mellifera* L (Hymenoptera: Apidae). *World Journal of Agricultural Sciences, 3,* 7-11.

Amer, M. M., El-sayed, T. T., Bakheit, H. K., Mostafa, S. A., & El-sayed, Y.A. (2008). Pathogenicity and genetic variability of five entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis*. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 4,* 354–367.

Aregger, E. (1992). Conidia production of the fungus *Beauveria brongniartii* on barley and quality evaluation during storage at 2°C. *Journal of Invertibrate Pathology, 59,* 2-10.

Blanford, S., Jenkins, N. E., Christian, R., Chan, B. H.K., Nardini, L., Osae, M., Koekemoer, L., Coetzee, M., Read, A. F., & Thomas, M. (2012). Storage and persistence of a candidate fungal biopesticide for use against adult malaria vectors. *Malaria Journal, 11,* 1-14.

Borman, A. M., Szekely, A., Campbell, C. K., & Johnson, E. M. (2006). Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia, 161,* 361–368.

Chong-Rodríguez, M. J., Maldonado-Blanco, M. G., Hernández-Escareño, J. J., Galán-Wong, L. J.,& Sandoval-Coronado, C. F. (2011). Study of *Beauveria bassiana* growth, blastospore yield, desiccation-tolerance, viability and toxic activity using different liquid media. *African Journal of Biotechnology, 10,* 5736-5742.

Daoust, R. A., & Roberts, D. W. (1983). Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: Effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquito. *Journal of Invertebrate Pathology, 41,* 143-150.

Godonou, I., James, B., Atcha-Ahowé, C., Vodouhè, S., Kooyman, C., Ahanchédé, A., & Korie, S. (2009). Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Protection, 28,* 220–224.

Haron, K., Mohammed, A. T., Halim, R. M., & Din, A. K. (2008). Palm-based bio-fertilizer from decanter cake and boiler ash of palm oil mill. *Malaysian Palm Oil Board (MPOB) Information Series (MPOB TT No. 412)*, *14.*

Hegedus, D. D, Bidochka, M. J., & Khachatourians, G. G. (1990). *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology, 33,* 641-647.

Hong, T. D., Ellis, R. H., & Moore, D. (1997). Development of a model to predict the effect of temperature and moisture for fungal spore longevity. *Annual of Botany, 79,* 121-128.

Hong, T. D., Gunn, J., Ellis, R. H., Jenkins, N. E., & Moore, D. (2001). The effect of storage environment on the longevity of conidia of *Beauveria bassiana*. *Mycological Research, 105,* 597-602.

Jackson, M. A. (1997). Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 19,* 180-187.

Juntaraniyom, T. (2008). Zero waste process of palm oil. *Journal of Hatyai Academic, 2,* 159-164. (in Thai)

Kassa, A., Brownbridge, M., Pakker, B. L.,Skinner, M., Gouli, V., Gouli, S., Guo, M., Lee, F., & Hata, T. (2008). Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research, 112*, 583-591.

Kivan, M. (2007). Pathogenicity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var anisoplia (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutelleridae) *Entomologia Generalis*, *30,* 63-69.

Kruawal, K., Sacher, F., Werner, A., Müller, J., & Knepper, T. P. (2005). Chemical water quality in Thailand and its impacts on drinking water production in Thailand. *Science of the Total Environment, 340,* 57-70.

Lohmeyer, K.H., & Miller, J. A. (2006). Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritant* (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, *99,* 1943-1947.

Magan, N. Ramirez, M. L., & Chulze, S. N. (2004). Impact of osmotic and matric water stress on germination, growth, mycelial water potentials and endogenous accumulation of sugars and sugar alcohols in *Fusarium graminearum*. *Mycologia*. *96,* 470-478.

Oliveira, I., Pereira, J. A., Bento, A., & Baptista, P. (2011). Viability of *Beauveria bassiana* isolates after storage under several preservation methods. *Annual Microbiology, 61,* 339-344.

Pasarell, L., & McGinnis, M. R.(1992). Viability of fungal cultures maintained at -70 degree C. *Journal of Clinical Microbiology*. *30,* 1000-1004.

Petlamul, W., & Prasertsan, P. (2012). Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, spores production, radial growth and enzyme activity. *Mycobiology, 40,* 111-116.

Petlamul, W., & Prasertsan, P. (2014a). Spore production of an entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* BNBCRC for biocontrol: response surface optimization of medium using decanter cake from palm oil mill. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 57,* 201-208.

Petlamul, W., & Prasertsan, P. (2014b). Medium optimization for production *Beauveria bassiana* BNBCRC spores from biohydrogen effluent of palm oil mill using taguchi design. *International Journal of Bioscience Biochemistry and Bioinformatics, 4,* 105-110.

Petlamul, W., & Prasertsan, P. (2015). Application of Response Surface Methodology for Spore Production Optimization of *Beauveria bassiana* Using Biohydrogen Effluent-Based Medium from Palm Oil Mill. *The Proceeding of Kasetsart University Annual Conference, 53,* 59-66.

Pham, T. A., Kim, J. J., Kim, S. G., & Kim, K. (2009). Production of spore of entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a submerged batch culture. *Mycobiology*. *37,* 218-224.

Razak, M. N. A., Ibrahim, M. F., Yee, P. L., Hassan, M. A., & Abd-Aziz, S. (2012). Utilization of oil palm decanter cake for cellulase and polyoses production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering, 17,* 547-555.

Rombach, M. C., Humber, R. A., & Roberts, D. W. (1987). *Metarhizium flavoviride* var. *minus* var. *nov*., a pathogen of plant and leaf hoppers on rice in the Philippines and Solomon Islands. *Mycotaxon, 27,* 87-92.

Soundarapandian, P., & Chandra, R. (2007). Mass production of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota; Hyphomycetes) in the laboratory. *Research Journal of Microbiology, 2,* 690-695.

Thai-PAN (Warning network of chemical pesticides). (2011). Documents of the Conference to monitor agricultural chemicals. Retrieved March 4, 2015, from http://www.thaipan.org/document.

Ubon, W., Cheewasedtham, W., Prasertsongskun, S., & Tjell, J. C. (2007). Potential of Organic residues from concentrated latex, fish processing and palm oil industries in the preparation of planting materials for garden grass. In. *Proceeding the 9th Symposium on Graduate Research of KKU,* KonKaen University.

Wakefield, M. E. (2006). Factors affecting storage insect susceptibility to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Alternative Methods to Chemical Control*, *9*, 855-862.

Xian-shi, Zhong, Y.X., & Lin-lin, X. (2004). Specific spoilage organisms from aquatic product and prediction & prolongation of the shelf life.*Chinese Academy of Fisheries Sciences*. Shanghai: East China Sea Fisheries Research Institute

Xing, W., Dong-jie, N., Xiao-shuang., Y., & You-cai, Z. (2008). Optimization of methane fermentation from effluent of bio-hydrogen fermentation process using response surface methodology. *Bioresource Technology*. *99,* 4292-4299.

Yahya, A., Sye, C. P., Ishola, T. A., & Suryanto, H. (2010). Effect of adding palm palm oil mill decanter cake slurry with regular turning operation on the composting process and quality of compost from oil palm empty fruit bunches. *Bioresource Technology, 101,* 8736-8741.

Zabriskie, D. W., Armiger, W. B., Phillips, D. H., & Albano, P. A. (1999). Trader´s guide to fermentation media formulation. 5th edition. *Traders Protein*. Tennessee USA.