

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์
2. โครงการวิจัย : วิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ
- กิจกรรม : การผลิตขยายและการใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การเพาะขยายเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยอาหารสูตรต่างๆ
- ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for Insect Pests Control on other media
4. คณะผู้ดำเนินงาน :
 - หัวหน้าการทดลอง : นางสาวนันทน์ พินศรี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 - ผู้ร่วมงาน : นายสมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 - นายอิศเรศ เทียนทัต สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 - นางสาวภัทรพร สรรพนุเคราะห์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
5. บทคัดย่อ : การศึกษาการเพาะขยายเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* มีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นแนวทางให้เกษตรกรได้สูตรอาหารที่หาง่ายและมีต้นทุนการผลิตต่ำ ดำเนินการทดสอบในห้องปฏิบัติการที่กลุ่มกีฏและสัตววิทยา ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2561 โดยใช้ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ของกรมวิชาการเกษตร ศึกษาคุณสมบัติวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* ทั้งหมด 20 ชนิด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการตรวจนับโคโลนีและตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น พบว่ามีสูตรอาหารเพียง 3 สูตร คือ สูตรซูปก้อน สูตรหมู+ธาตุอาหารเสริมของพืช, สูตรซูปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริมของพืชและสูตรซูปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริมของพืช สามารถเพาะเลี้ยงได้และมีจำนวนโคโลนีปริมาณใกล้เคียงกับวิธี

มาตรฐานที่เพาะเลี้ยงด้วย NB (Nutrient Broth) พบจำนวนโคโลนีเฉลี่ย 1.70×10^8 , 3.30×10^8 , 2.60×10^8 และ 1.73×10^9 CFU/ml ตามลำดับ ตรวจนับเซลล์ Total cell count พบจำนวนเซลล์เท่ากับ 3.50×10^8 , 6.00×10^8 , 4.50×10^8 และ 7.20×10^8 cell/ml ตามลำดับและตรวจนับสปอร์ Spore count มีจำนวนสปอร์ 1.40×10^8 , 1.20×10^8 , 5.50×10^8 และ 1.50×10^9 spore/ml ตามลำดับ โดยมีต้นทุนของอาหารต่อปริมาตร 200 มล. เท่ากับ 5.9, 5.9, 6.3 และ 10.40 บาทตามลำดับ ทดสอบประสิทธิภาพเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานคือเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะขยายด้วย NB (Nutrient Broth) ด้วยวิธี bioassay กับหนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้หอม และหนอนกระทู้ผัก ในห้องปฏิบัติการ วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ผลการทดสอบเมื่อครบ 7 วัน พบว่าการตายของหนอนกระทู้ผักมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3.30-60.00 เปอร์เซ็นต์ การตายของหนอนกระทู้หอมตายเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 16.60-80.00 เปอร์เซ็นต์ และการตายของหนอนเจาะสมอฝ้ายตายเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 23.30-66.60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพต่ำกว่า *B. thuringiensis* ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานกับหนอนทั้ง 3 ชนิด ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพของเชื้อที่ได้จากการเพาะขยายจากอาหารอย่างง่ายทั้ง 3 สูตร มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดหนอนต่ำกว่าสูตรมาตรฐาน ซึ่งมาจากการใช้ความเข้มข้นของเชื้อที่ต่ำกว่าสูตรมาตรฐานและผลึกโปรตีนที่ได้มีจำนวนน้อยกว่าแต่เมื่อพิจารณาจากต้นทุนและศักยภาพของสูตรอาหารสามารถนำมาพัฒนาต่อไปได้

Abstract:

This study aimed to develop a low-cost-effective medium for culturing *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* as pests control by using local raw materials. The present study was conducted at Entomology and Zoology group, Plant Protection Research and Development office, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand. Twenty local raw

materials were used to develop different *B. thuringiensis* media. Each medium was used to culture *B. thuringiensis* for 72 hours, and then the colonies were counted and checked for other types of microbial contamination. The results demonstrated that only 3 media including pork soup cubes + Trace Elements, chicken soup cubes + Trace Elements, beef soup cubes + Trace Elements can be used to culture *B. thuringiensis* and the number of colonies was closed to the standard method cultured with NB (Nutrient Broth). The average colonies count was 1.70×10^8 , 3.3×10^8 , 2.60×10^8 , and 1.73×10^9 CFU, respectively. Total cell counts were found 3.50×10^8 , 6.00×10^8 , 4.50×10^8 , and 7.20×10^8 cell/ml, respectively. Spore counts were found 1.40×10^8 , 1.2×10^8 , 5.50×10^8 , and 1.50×10^9 spore/ml, respectively. The cost of each medium per 200 ml was 5.9, 5.9, 6.3, and 10.40 Bath, respectively. Moreover, the efficacy between 3 media and standard NB in bioassay using *Spodoptera litura*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa armigera* cultures were performed in CRD with 5 treatments and 3 replications using larvae age 3. The results showed that the mortality of *Spodoptera litura* was inbetween 3.30-60.00 percent the mortality of *Spodoptera exigua* was inbetween 16.60-80.00 percent. The mortality of *Helicoverpa armigera* was inbetween 23.30-66.60 percent which showed less effective than *B. thuringiensis* when cultured in NB with regards to all 3 types of worms. These results were caused from lower concentrations of 3 media than NB and the amount of

protein crystals obtained were lesser than cultured in standard medium. However, local raw materials can be used for culturing *B. thuringiensis* as they contributed lower cost of medium and practicability of farmer utilization.

6. คำนำ

การวิจัยการใช้เชื้อจุลินทรีย์กำจัดแมลงในประเทศไทย เป็นที่ยอมรับว่าเป็นแนวทางหนึ่งในการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพ มีวิธีการพ่นเหมือนสารฆ่าแมลงในลักษณะสารฆ่าแมลงที่มีชีวิต (living insecticide) อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อจุลินทรีย์กำจัดแมลงมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้สารฆ่าแมลงในด้านการมีความเฉพาะเจาะจงต่อศัตรูพืชเป้าหมาย ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม มีความปลอดภัยสูง และโอกาสในการต้านทานต่อสารฆ่าแมลงมีน้อย (Dulmage, 1981; อัจฉรา, 2534) มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชสูงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะแมลงศัตรูพืชที่กัดกินใบ สามารถกำจัดได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์กำจัดแมลงจึงมีประสิทธิภาพที่จะควบคุมแมลงศัตรูพืชก่อนที่จะถึงระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ (ETL) ซึ่งแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* หรือที่เรียกกันทั่วไปว่าแบคทีเรียบีทีได้รับการยอมรับและมีการแนะนำส่งเสริมให้ใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชอย่างกว้างขวาง แต่การใช้แบคทีเรีย *B. thuringiensis* กำจัดแมลงศัตรูพืชก็มีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น ออกฤทธิ์ช้า เกษตรกรต้องมีความรู้ ความเข้าใจในคุณสมบัติของเชื้อ *B. thuringiensis* เทคนิคการพ่นสารที่ถูกต้องและข้อสำคัญคือ ค่าใช้จ่ายของ *B. thuringiensis* ค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับการใช้สารเคมีกำจัดแมลงต่อต้านทุนในการผลิตแบคทีเรียบีที

สูตรอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบีทีเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากบางสายพันธุ์ของ *B. thuringiensis* จะไม่เจริญใน mineral glucose media นอกจากจะเติมกรดอะมิโนบางชนิดซึ่งมาจากแหล่งต่างๆ บางสายพันธุ์การเจริญเติบโตจะต้องถูกกระตุ้นโดย yeast extract ปริมาณเล็กน้อย ซึ่งในการสร้าง

สปอร์บีทีจะถูกกระตุ้นโดย inorganic ions ได้แก่ Ca^{2+} และ Mn^{2+} phosphate salts แต่จะเติมในปริมาณมากกว่าที่ต้องการ สำหรับการเจริญเติบโตเพราะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ ส่วนการปรับ Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} และ Zn^{2+} ไอออนจะส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ (Entwistle และคณะ, 1993) จากการรายงานของ Singer and Rogoff (1968) พบว่า *B. thuringiensis* จะเติบโตช้าและสร้างสปอร์น้อยถ้าขาดอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อและมีน้ำตาลกลูโคสและเกลือมากเกินไป ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการเติมกรดอะมิโนจะช่วยทำให้เชื้อ *B. thuringiensis* กลับมาเจริญเติบโตได้จะเห็นได้ว่าองค์ประกอบต่างๆในสูตรอาหารจึงมีส่วนสำคัญในการผลิตเชื้อ *B. thuringiensis* อย่างมาก ประเทศไทยมีการศึกษาการใช้สูตรอาหารอย่างง่ายที่มีราคาถูก เช่น ดับหมูปดผสมรวมกับกากน้ำตาลกากถั่วเหลืองและ CaCO_3 ดับวัวปดผสมรวมกับกากถั่วเหลือง กากน้ำตาลและ CaCO_3 , ดับไก่ปดผสมรวมกับกากถั่วเขียว กากน้ำตาลและ CaCO_3 สูตรสุดท้ายปลาป่นผสมรวมกับกากน้ำตาล กากถั่วเหลืองและ CaCO_3 เป็นต้น โดยศึกษาและเปรียบเทียบในแต่สูตรอาหาร นำมาใช้เลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* โดยทำการฆ่าเชื้ออาหารแล้วปรับ ค่า pH ด้วยในหลายๆสูตร ซึ่งพบว่า *B. thuringiensis* มีการเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ในระดับที่ดี (Sothorn, 1975) นอกจากนี้ในปี 2553 อิศเรศและคณะ ทำการศึกษาชนิดและปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำได้ง่ายในประเทศไทย คือ นมถั่วเหลืองและนมผงสำเร็จรูปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วนต่างๆ โดยใช้วิธีการผลิตแบบมาตรฐาน พบว่ากรรมวิธีที่ดีที่สุด คือ นมถั่วเหลืองอัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ปริมาณเฉลี่ยเชื้อ *B. thuringiensis* 1.29×10^9 CFU/ml นอกนี้ได้ทำการทดลองผลิตเชื้อ *B. thuringiensis* ด้วยวิธีการพื้นบ้าน โดยใช้นมถั่วเหลืองอัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร พบว่าในการผลิตมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยมีปริมาณเชื้อที่ได้เฉลี่ย 6.49×10^4 cfu/ml

อีกทั้งนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนค่อนข้างต่ำ พบหนอนตายเฉลี่ย 31.10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสมชัยและคณะ (2555) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* ที่ผลิตด้วยวิธีต่างๆ ทำการทดสอบด้วยอาหารเหลว (submerged culture) ได้แก่ น้ำมะพร้าวผสมไข่ไก่, น้ำมะพร้าว, นมข้นหวาน และหางนม และอาหารแข็ง (solid state fermentation) ที่ ได้แก่ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์, ข้าวฟ่าง, ชานอ้อย ผสมรำ และข้าวสุกเป็นวัตถุดิบที่สามารถหาได้ทั่วไป พบว่าการเพาะขยายเชื้อด้วยอาหารแข็ง สามารถเพาะขยายเชื้อได้ดีกว่าการใช้อาหารเหลว และได้นำผลผลิตที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผัก วัย 2 ด้วย Feeding method บนอาหารเทียม แต่พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากเหลวและอาหารแข็งมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานซึ่งเกิดจากสูตรอาหารเหล่านี้นี้ขาดแร่ธาตุที่จำเป็นในการสร้างสปอร์และผลิตโปรตีน นอกจากนี้ในต่างประเทศมีการนำผลิตภัณฑ์ที่มีราคาถูก เช่น ธัญพืช ถั่วน้ำมัน เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน แหล่งโปรตีน รวมกับกากน้ำตาลที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตเพื่อให้ *B. thuringiensis* สร้างผลิตโปรตีน (Abdel-Hameed *et al.*, 1990, Mummigatti and Raghunathan, 1990) ในปี 1991 Desai and Shethna ยังใช้นมผง น้ำมะพร้าวและถั่วเหลืองเป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* subsp. *islariensis* ได้ด้วย

จากการทดลองที่ผ่านมาดังกล่าวจะเห็นได้ว่าสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* เป็นสิ่งสำคัญและมีบทบาทต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และสร้างสปอร์ที่ให้สร้างพิษสำหรับกำจัดแมลง แต่สูตรอาหารชนิดต่างๆที่นำมาใช้ยังขาดข้อมูลด้านธาตุอาหารที่เป็นส่วนสำคัญในการเพาะขยายเชื้อ รวมถึงวิธีการเพาะขยายเชื้อที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาการเพาะขยายเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีต่างๆ รวมทั้งชนิดของ

สารอาหารที่ใช้เพาะขยาย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ต้องการ มีประสิทธิภาพ ช่วยให้เกษตรกรสามารถนำไปปรับใช้ได้ด้วยตนเอง ซึ่งจะช่วยให้เกษตรกรสามารถผลิตแบคทีเรีย *B. thuringiensis* โดยวิธีง่ายๆ จากวัสดุอุปกรณ์ที่มีอยู่แล้วในท้องถิ่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*
สายพันธุ์กรมวิชาการเกษตร
2. หนอนกระพุ้งหอม หนอกระพุ้งผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย
3. อาหารเทียมเลี้ยงแมลง
4. อาหารเหลว Nutrient Broth
5. เครื่องเขย่า (Shaker)
6. ตูบมเชื้อ
7. ตูยเชื้อ
8. Micropipette, eppendorp tube
9. ถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์
10. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1. การศึกษาคุณสมบัติวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus thuringiensis*

นำวัตถุดิบที่มีรายงานการใช้ประโยชน์และมีองค์ประกอบที่คาดว่าจะสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการเพาะขยายเชื้อแบคทีเรีย มาวิเคราะห์หาธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แร่ธาตุหลักที่สำคัญ ได้แก่ organic carbon, N, K, เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคัดเลือกอาหารสำหรับนำไปเพาะขยายเชื้อต่อไป โดยเปรียบเทียบกับอาหารเหลวมาตรฐานที่ใช้ในการเพาะขยายเชื้ออยู่เดิม คือ Nutrient Broth โดยจะเน้นการใช้วัตถุดิบจากแหล่งต่างๆที่เกษตรกรสามารถหาซื้อได้ง่ายหรือนำของเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมทางการเกษตรชนิดต่างๆ ที่คาดว่าจะมีธาตุอาหารที่เหมาะสมในการเพาะขยายเชื้อแบคทีเรีย กลับมาใช้ใหม่ให้เกิดประโยชน์ นอกจากจะช่วยลดมลภาวะที่เกิดจากของเสียแล้วยังเป็นการประหยัดต้นทุนในการผลิตได้เป็นอย่างดี ทั้งหมด 20 สูตรอาหาร ดังนี้

อาหารสูตรที่ 1 ประกอบด้วย นมถั่วเหลือง 100 มิลลิลิตร+อาหาร
แมว 100 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 2 ประกอบด้วย นมถั่วเหลือง 100 มิลลิลิตร+
อาหารสุนัข 100 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 3 ประกอบด้วย นมถั่วเหลือง 80 มิลลิลิตร+ตับไก่
80 มิลลิลิตร+กากน้ำตาล 40 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วย นมถั่วเหลือง 80 มิลลิลิตร+นมข้น
หวานหวาน 40 มิลลิลิตร+อาหารแมว 80 มิลลิลิตร+เกลือ 1
กรัม+ผงฟู 2 กรัม+ปุ๋ย(18-18-18) 1 กรัม

อาหารสูตรที่ 5 ประกอบด้วย นมถั่วเหลือง 80 มิลลิลิตร+นมข้น
หวาน 40 มิลลิลิตร+อาหารสุนัข 80 มิลลิลิตร+เกลือ 1 กรัม+ผง
ฟู 2 กรัม+ปุ๋ย(18-18-18) 1 กรัม

อาหารสูตรที่ 6 ประกอบด้วย นมถั่วเหลือง 60 มิลลิลิตร+นมวัว
60 มิลลิลิตร+นมข้นหวานหวาน 20 มิลลิลิตร+อาหารแมว 60
มิลลิลิตร+เกลือ 1 กรัม+ผงฟู 2 กรัม+ปุ๋ย(18-18-18) 1 กรัม

อาหารสูตรที่ 7 ประกอบด้วย นมถั่วเหลือง 100 มิลลิลิตร+นมผง
100 กรัม+แป้งมัน 2 กรัม+เกลือ 1 กรัม+ผงฟู 2 กรัม+ปุ๋ย(18-
18-18) 1 กรัม

อาหารสูตรที่ 8 ประกอบด้วย นมวัว 100 มิลลิลิตร+นมผง 100
กรัม+แป้งมัน 2 กรัม +เกลือ 1 กรัม+ผงฟู 2 กรัม+ปุ๋ย(18-18-
18) 1 กรัม

อาหารสูตรที่ 9 ประกอบด้วย นมวัว 80 มิลลิลิตร+นมข้นหวาน
40 มิลลิลิตร+อาหารแมว 80 มิลลิลิตร+เกลือ 1 กรัม+ผงฟู 2
กรัม+ปุ๋ย(18-18-18) 1 กรัม

อาหารสูตรที่ 10 ประกอบด้วย อาหารแมว 100 มิลลิลิตร+นมผง
100 กรัม

อาหารสูตรที่ 11 ประกอบด้วย อาหารแมว 100 มิลลิลิตร+นม
ข้นหวาน 100 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 12 ประกอบด้วย น้ำเต้าหู้ 100 มิลลิลิตร+น้ำผึ้ง 90
มิลลิลิตร+เกลือ 1 กรัม +ครีมเทียม 10 กรัม

อาหารสูตรที่ 13 ประกอบด้วย ซุปก้อนสูตรหมู 10 กรัม+ น้ำเปล่า 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 14 ประกอบด้วย ซุปก้อนสูตรไก่ 10 กรัม+น้ำเปล่า 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 15 ประกอบด้วย ซุปก้อนสูตรเนื้อ 10 กรัม+ น้ำเปล่า 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 16 ประกอบด้วย ซุปก้อนสูตรหมู 10 กรัม+ธาตุอาหารเสริมของพืช (เหล็ก+สังกะสี+แมงกานีส+โบรอน+ ทองแดง+โมลิตินัม) 0.1 กรัม +น้ำเปล่า 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 17 ประกอบด้วย ซุปก้อนสูตรไก่ 10 กรัม+ธาตุอาหารเสริมของพืช (เหล็ก+สังกะสี+แมงกานีส+โบรอน+ ทองแดง+โมลิตินัม) 0.1 กรัม + น้ำเปล่า 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 18 ประกอบด้วย ซุปก้อนสูตรเนื้อ 10 กรัม+ธาตุอาหารเสริมของพืช (เหล็ก+สังกะสี+แมงกานีส+โบรอน+ ทองแดง+โมลิตินัม) 0.1 กรัม+ น้ำเปล่า 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 19 ประกอบด้วยน้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 20 ประกอบด้วยอาหารเหลว Nutrient Broth 200 มิลลิลิตร

โดยจัดเตรียมวัตถุดิบทุกอย่างให้อยู่ในรูปของของเหลว ในปริมาตร 200 มิลลิลิตรในทุกสูตร หลังจากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกสูตรด้วยเครื่องมือที่ใช้สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) เพื่อกำจัดและป้องกันการปนเปื้อน แล้วจึงส่งวิเคราะห์องค์ประกอบและแร่ธาตุอาหารจากวัตถุดิบต่อไป

บันทึกข้อมูล

- ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบและธาตุอาหารในวัตถุดิบชนิดต่างๆ

ขั้นตอนที่ 2. ศึกษาการเพาะขยายแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* จากสูตรอาหารชนิดต่างๆ

2.1 นำเชื้อ *B. thuringiensis* มาเพาะกล้าเชื้อ แล้วนำไปปลูกเชื้อลงในวัตถุดิบชนิดต่างๆ ในขั้นตอนที่ 1 หลังจากนั้นเพิ่ม

ปริมาณเชื้อด้วยวิธีการใช้เครื่องเขย่า (Shaker) เพื่อให้เกิดการหมวนเวียนของอาหารและเชื้อ *B. thuringiensis* ได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ โดยใช้กล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักรวตดูดิบในปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าที่อัตรา 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

2.2 ศึกษาการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์โดยตรวจวัดการเจริญเติบโตของ *B. thuringiensis* และปริมาณของ crystal toxin ที่เชื้อ *B. thuringiensis* ผลิตขึ้นมาจากข้อ 2.1 โดยเก็บตัวอย่างที่ 72 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเซลล์ (Total cell count) ด้วยการนำตัวอย่างเชื้อมาเจือจางแบบ serially dilution ดูดสารละลายที่เจือจางนี้มา 0.1 ml แล้ว spread plate บนอาหาร NA บ่มเชื้อที่ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ แล้วจึงตรวจนับโคโลนี

2.3 ตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเข้ามาในระหว่างกระบวนการผลิต

บันทึกข้อมูล

- บันทึกการเจริญของเชื้อ *B. thuringiensis* ในแต่ละวิธีการผลิต
- ตรวจสอบและนับปริมาณของเซลล์และสปอร์ที่เชื้อ *B. thuringiensis* สร้างขึ้น
- บันทึกปริมาณและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* ที่เจริญในสูตรอาหารต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ

นำ *B. thuringiensis* ที่เจริญในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ นำมาทดสอบในห้องปฏิบัติการ ใช้หนอนผีเสื้อศัตรูพืชที่สำคัญคือ หนอนกระทุ้หอม หนอนกระทุ้ผักและหนอนเจาะสมอฝ้ายที่เก็บจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเทียมจนได้หนอนรุ่นที่ 1 หรือ 2 นำมาทดสอบหาประสิทธิภาพของเชื้อ *B. thuringiensis* ที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารอย่างง่ายตามอัตราความเข้มข้นต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 3 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุปก้อนสูตรไก่+ธาดูอาหารเสริมของพืช

กรรมวิธีที่ 2 ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริมของพีช

กรรมวิธีที่ 3 ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริมของพีช

กรรมวิธีที่ 4 Nutrient broth(NB)

กรรมวิธีที่ 5 ควบคุม (control)

ทดสอบความเป็นพิษ โดยหยดสูตรอาหารที่มีเชื้อ *B. thuringiensis* แล้วบนผิวหน้าของอาหารเทียม (surface layered) ที่เจาะโดยอุปกรณ์เจาะจุกคอร์ก (Cork borer) เบอร์ 2 ใช้สารละลาย 5 ไมโครลิตรต่อชิ้นอาหาร ปล่อยให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 3 มิลลิเมตร หลอดละ 1 ชิ้นต่อหนอนวัยสอง 1 ตัว ใช้หนอนทดลองซ้ำละ 10 ตัว บันทึกข้อมูล

- ตรวจนับจำนวนหนอนที่ตายในแต่ละกรรมวิธีทุก 24 ชั่วโมงหลังการทดลองจนครบ 7 วัน

- ข้อมูลที่นำมาคำนวณหาอัตราการตายของหนอน ถ้าเปอร์เซ็นต์การตายในกรรมวิธี Control (น้ำเปล่า) ตายมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถใช้ผลการทดลองนี้ได้และถ้าเปอร์เซ็นต์การตายในกรรมวิธี Control (น้ำเปล่า) ตายอยู่ระหว่าง 5-20 เปอร์เซ็นต์ต้องนำอัตราการตายทั้งหมดมาปรับด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925) แต่ถ้าเปอร์เซ็นต์การตายในกรรมวิธี Control (น้ำเปล่า) น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถใช้เปอร์เซ็นต์การตายจริง โดย Abbott's formula คำนวณได้ดังนี้:

เปอร์เซ็นต์การตายจริง = $\frac{\text{เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่ได้รับบีที}-\text{เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนในชุดควบคุม}}{100 \text{ เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนในชุดควบคุม}}$

100 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนในชุดควบคุม

- นำข้อมูลจำนวนหนอนวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เวลาและสถานที่

: ตุลาคม 2560 – กันยายน 2561

: ห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

11. ผลการทดลองและวิจารณ์

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาคุณสมบัติอาหารเพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

Bacillus thuringiensis

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* นำวัตถุดิบที่จัดหาได้มาผสมกันเป็นสูตรอาหารต่างๆ ให้เป็นของเหลวที่ปริมาตร 200 มิลลิเมตร แล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อโรค(autoclave)

เมื่อเสร็จทำการลงกล้าเชื้อ *B. thuringiensis* ที่ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml ปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อหนึ่งสูตรอาหาร หลังจากนั้น นำมาวิเคราะห์ ที่ห้องปฏิบัติการเคมีและสิ่งแวดล้อม ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งธาตุอาหารหลัก สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. thuringiensis* ใช้มี Nutrient broth(NB) เป็นตัวเปรียบเทียบ คือ 1.คาร์บอน(C) วิเคราะห์และวิธีตรวจสอบ ด้วย Oxidation, titration (ตารางที่ 1) พบว่า NB มีปริมาณคาร์บอนอยู่ที่ 0.21 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับ สูตรที่ 14 ซุปก้อนสูตรไก่ สูตรที่ 13 ซุปก้อนสูตรหมู และสูตรที่ 15 ซุปก้อนสูตรเนื้อ มีปริมาณคาร์บอนอยู่ที่ 1.19, 1.48 และ 2.96 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

นอกจากนี้สูตรอาหารอื่นๆ ที่พบปริมาณคาร์บอน คือ สูตรที่ 17 ซุปก้อนสูตรไก่+หัวธาตุอาหารเสริม สูตรที่ 16 ซุปก้อนสูตรหมู+หัวธาตุอาหารเสริม สูตรที่18 ซุปก้อนสูตรเนื้อ+หัวธาตุอาหารเสริม สูตรที่ 9 นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 4 นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 8 นมวัว+นมผงเด็ก+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 5 นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารหมา+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 6 นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย+เกลือ สูตรที่ 7 นมถั่วเหลือง+นมผงเด็ก+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 3 นมถั่วเหลือง+ตับไก่+กากน้ำตาล สูตรที่ 1 นมถั่วเหลือง+อาหารแมว สูตรที่ 2 นมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข สูตรที่ 11 อาหารแมว+นมข้นหวาน สูตรที่ 12 น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม สูตรที่ 10 อาหารแมว+นมผงเด็ก และสูตรที่ 19 น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง พบปริมาณคาร์บอน 4.35, 4.54, 5.07, 9.26, 9.62, 9.98, 10.51, 10.87, 18.17, 272, 293, 333, 391, 503, 582 และ ไม่พบปริมาณคาร์บอน มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

ธาตุอาหารหลักตัวที่สองที่นำไปวิเคราะห์ คือ ธาตุไนโตรเจน(N) วัดปริมาณไนโตรเจน โดย Kjeldahl method(ตารางที่ 1) พบว่า NB มีไนโตรเจน 1,029 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีสูตรอาหารที่ใกล้เคียง คือ สูตรที่ 19 น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง สูตรที่ 14 ซุปก้อนสูตรไก่และสูตรที่ 17 ซุปก้อนสูตรไก่+หัวธาตุอาหารเสริมพบปริมาณไนโตรเจน 1110.6, 880 และ 790 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

นอกจากนี้สูตรอาหารอื่นๆที่พบปริมาณไนโตรเจน คือ สูตรที่ 16 ซุปก้อนสูตรหมู+หัวธาตุอาหารเสริม สูตรที่ 13 ซุปก้อนสูตรหมู สูตรที่ 11 อาหารแมว+นมข้นหวาน สูตรที่ 1 นมถั่วเหลือง+อาหารแมว สูตรที่ 2 นมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข สูตรที่ 18 ซุปก้อนสูตรเนื้อ+หัวธาตุอาหารเสริม สูตรที่ 3 นมถั่วเหลือง+ตับไก่+กากน้ำตาล สูตรที่ 12 น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม สูตรที่ 8 นมวัว+นมผงเด็ก+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 10 อาหารแมว+นมผงเด็ก สูตรที่ 5 นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารหมา+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 7 นมถั่วเหลือง+นมผงเด็ก+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 15 ซุปก้อนสูตรเนื้อ สูตรที่ 4 นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 6 นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย+เกลือ สูตรที่ 9 นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย พบปริมาณไนโตรเจน 521, 593, 1,295, 1,695, 1,761, 2,550, 2,570, 2,580, 2,589, 3,265, 3,408, 3,484, 4,471, 4,493, 5,093 และ 5,236 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

ธาตุอาหารหลักตัวที่สามที่นำไปวิเคราะห์ คือ โพแทสเซียม(K) วัดปริมาณโพแทสเซียมด้วย Atom Emission Spectrophotometer (ตารางที่ 1) พบว่า NB มีโพแทสเซียม 213 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีสูตรอาหารที่ใกล้เคียง คือ สูตรที่ 15 ซุปก้อนสูตรเนื้อ สูตรที่ 13 ซุปก้อนสูตรหมูและสูตรที่ 14 ซุปก้อนสูตรไก่ พบปริมาณโพแทสเซียม คือ 170, 78 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีสูตรอาหารอื่นๆ ที่พบปริมาณโพแทสเซียม คือ สูตรที่ 2 นมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข สูตรที่ 1 นมถั่วเหลือง+อาหารแมว สูตรที่ 16 ชุปก้อนสูตรหมู+หัวธาตุอาหารเสริม สูตรที่ 12 น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม สูตรที่ 17 ชุปก้อนสูตรไก่+หัวธาตุอาหารเสริม สูตรที่ 11 อาหารแมว+นมข้นหวาน สูตรที่ 18 ชุปก้อนสูตรเนื้อ+หัวธาตุอาหารเสริม สูตรที่ 10 อาหารแมว+นมผงเด็ก สูตรที่ 5 นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารหมา+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 8 นมวัว+นมผงเด็ก+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 4 นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 6 นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย+เกลือ สูตรที่ 7 นมถั่วเหลือง+นมผงเด็ก+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 9 นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 3 นมถั่วเหลือง+ดัดไก่+กากน้ำตาล สูตรที่ 19 น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง พบปริมาณโพแทสเซียม 704, 742, 1,038, 1,086, 1,113, 1,120, 1,137, 1,347, 1,668, 1,950, 1,998, 2,111, 2,200, 2,503, 5,720 และ 7,814 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

อีกทั้งนำสูตรอาหารทุกสูตรตรวจค่า pH วัดด้วยเครื่องวัด pH (EUTECH pH700) (ตารางที่ 1) พบว่า NB มีค่า pH ที่ 6.69 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงความเป็นกลางเหมือนกับ ไมตรี(2539) อ้างไว้ว่า แบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. นี้สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C หรืออุณหภูมิห้อง ในช่วงพีเอช(pH) ระหว่าง 6.5-7.0 พร้อมกับสภาวะที่มีออกซิเจนอย่างเต็มที่และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาล กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่มีปีที่บางสายพันธุ์ที่ต้องการวิตามินในการเจริญเติบโตด้วย ซึ่งมีสูตรอาหารที่ใกล้เคียง คือ สูตรที่ 2 นมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข สูตรที่ 5 นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารหมา+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 1 นมถั่วเหลือง+อาหารแมว พบค่า pH คือ 6.67, 6.66 และ 6.86

นอกจากนี้มีสูตรอาหารต่างๆ ที่มีค่า pH เป็นกลางไปจนถึงเป็นด่าง คือ สูตรที่ 4 นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 8 นมวัว+นมผงเด็ก+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 9 นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 7 นมถั่วเหลือง+นมผงเด็ก+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 10 อาหารแมว+นมผงเด็ก สูตรที่ 6 นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย+เกลือ สูตรที่ 11 อาหารแมว+นมข้นหวาน สูตรที่ 19 น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง สูตรที่ 15 ซุปก้อนสูตรเนื้อ สูตรที่ 14 ซุปก้อนสูตรไก่ สูตรที่ 12 น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม สูตรที่ 3 นมถั่วเหลือง+ตับไก่+กากน้ำตาล สูตรที่ 17 ซุปก้อนสูตรไก่+หัวธาตุอาหารเสริม สูตรที่ 18 ซุปก้อนสูตรเนื้อ+หัวธาตุอาหารเสริม สูตรที่ 13 ซุปก้อนสูตรหมู สูตรที่ 16 ซุปก้อนสูตรหมู+หัวธาตุอาหารเสริม พบค่า pH คือ 6.52, 6.46, 6.46, 6.37, 6.28, 6.27, 6.05, 6.04, 5.74, 5.69, 5.42, 4.94, 4.67, 4.67, 4.58 และ 4.27 ตามลำดับ

อีกทั้งได้นำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Fernando Hercos Valicente และคณะ (2010) ทำการทดลองเพาะเลี้ยงบีทีในอาหาร ได้แก่ กลูโคส 1.5%+แป้งถั่วเหลือง 0.5%+เกลือ สามารถเพาะเลี้ยงบีทีได้ 2.0×10^8 CFU /ml พบธาตุพบไนโตรเจน คาร์บอนและโพแทสเซียม 544.71, 12.971, และ 77.33 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งพบว่าสูตรอาหารนี้มีคุณสมบัติ แร่ธาตุ วัสดุและองค์ประกอบอย่างง่าย ใกล้เคียงกับ NB และสูตรอาหารอีก 4 สูตร คือ 1. ซุปก้อนสูตรหมู 2. ซุปก้อนสูตรไก่ 3. ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริมของพืช 4. ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริมของพืช แต่สุรางค์ (2561) ได้ทำการทดสอบ pH ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* ในอาหาร V-broth จะมีค่าอยู่ระหว่าง 4.3-5.6 ตลอดระยะการเจริญ ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. thuringiensis* ด้วย ซึ่งสอดคล้องกันกับสูตรอาหารในการทดลอง

นี้มี 7 สูตรอาหารที่มี pH เหมาะสม คือ 1.ตับไก่+นมถั่วเหลือง+กากน้ำตาล 2. น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม 3. ซุปก้อนสูตรหมู 4. ซุปก้อนสูตรไก่ 5. ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริมของพืช 6. ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริมของพืช 7. ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริมของพืช ซึ่งนำมาเป็นตัวเลือกในการเพาะเลี้ยงสูตรอาหารอย่างง่ายต่อไป

ในปี 1998 Wuhan ได้แนะนำว่าอาหารที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* ต้องมีไนโตรเจนและคาร์บอนที่เหมาะสมเป็นพื้นฐานและยังต้องมีอาหารธาตุรองที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ คือ แมกนีเซียม(Mg) แมงกานีส(Mn) เหล็ก(Fe) สังกะสี(Zn) และแคลเซียม(Ca) ดังนั้นเมื่อได้สูตรอาหารที่คิดว่าเหมาะสมแล้วจะนำไปวิเคราะห์ธาตุอาหารรองดังกล่าวเพิ่มเติมเพื่อช่วยในการตัดสินใจที่จะใช้สูตรอาหารต่าง ๆ มาเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* ต่อไป และเนื่องจากความต้องการธาตุอาหารของ *B. thuringiensis* ยังไม่มีมาตรฐานที่แน่ชัด มีความต้องการที่แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงด้วย อีกทั้งหากมีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* เพิ่มเติมอาจจะนำผงเกลือแร่หรือเครื่องดื่มสำหรับผู้ออกกำลังกายเพิ่มเติมลงในสูตรอาหารนี้ด้วยเพราะมีงานวิจัยของ ปทุมพร(2541) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *B. thuringiensis* JC121 พบว่าการเติมเกลือแร่หรือกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth สามารถช่วยเพิ่มปริมาณสปอร์ได้ดี

ขั้นตอนที่ 2. ศึกษาการเพาะขยายแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* จากสูตรอาหารชนิดต่างๆ

นำเชื้อ *B. thuringiensis* มาปลูกลงในวัตถุดิบ ทั้ง 20 ชนิด นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เนื่องมาจาก *B. thuringiensis* เป็นแบคทีเรียเมื่ออยู่ในสภาพไม่มีออกซิเจนหรือในสภาวะไร้อากาศจะมีการเจริญช้าและไม่มีการสร้างสปอร์

จึงต้องให้ออกซิเจนที่เพียงพอด้วยการเขย่า (Wuhan,1998) หลังจากนั้นนำไปตรวจนับจำนวนเซลล์ (Total cell count) ด้วยการนำตัวอย่างเชื้อมาเจือจางแบบ serially dilution พบว่าในสูตรอาหารอย่างง่าย ส่วนใหญ่ให้ผลผลิตของเชื้อค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับ Nutrient both (NB) (ตารางที่ 2) ซึ่งเป็นอาหารหลักที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 1.73×10^9 CFU/ml รองลงมาคือ สูตรที่ 17. ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริมของพืช สูตรที่ 18. ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริมของพืช สูตรที่ 15. ซุปก้อนสูตรเนื้อ สูตรที่ 14. ซุปก้อนสูตรไก่ สูตรที่ 16. ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริมของพืช สูตรที่ 13. ซุปก้อนสูตรหมู มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ย 3.3×10^8 , 2.60×10^8 , 2.1×10^8 , 2.00×10^8 , 1.43×10^8 CFU/ml ตามลำดับ

ในสูตรอาหารอย่างง่ายสูตรอื่นๆ พบจำนวนเซลล์ค่อนข้างต่ำ คือ สูตรที่ 12. น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม สูตรที่ 19 น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง สูตรที่ 11. อาหารแมว+นมข้นหวาน สูตรที่ 4. นมถั่วเหลือง+นมข้นหวานหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 6. นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย+เกลือ สูตรที่ 1. นมถั่วเหลือง+อาหารแมว สูตรที่ 7. นมถั่วเหลือง+นมผงเด็ก+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 10. อาหารแมว+นมผง สูตรที่ 3. นมถั่วเหลือง+ตับไก่+กากน้ำตาล สูตรที่ 2. นมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข สูตรที่ 5. นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารหมา+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 9. นมวัว+นมข้นหวานหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 8. นมวัว+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ย 3.87×10^7 , 2.46×10^7 , 2.32×10^7 , 2.28×10^7 , 2.04×10^7 , 1.88×10^7 , 1.65×10^7 , 1.23×10^7 , 1.2×10^7 , 2.77×10^6 , 2.09×10^6 , 6.30×10^5 , 1.61×10^5 CFU/ml ตามลำดับ

อีกทั้งได้ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์และสปอร์ โดยวิธี Total count ด้วย Haemocytometer (ตารางที่ 3) ซึ่งให้ผล

คล้ายคลึงกันกับการนำไปตรวจนับจำนวนเซลล์ (Total cell count) ด้วยวิธีการนำตัวอย่างเชื้อมาเจือจางแบบ serially dilution พบว่าสูตรอาหารที่ดีที่สุด คือ Nutrient both (NB) มีจำนวนเซลล์ 7.2×10^8 cell/ml และจำนวนสปอร์ 1.5×10^9 spore/ml รองลงมา คือ สูตรที่ 18. ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริมของพีช มีจำนวนเซลล์ 4.5×10^8 CFU/ml และจำนวนสปอร์ 5.50×10^8 CFU/ml สูตรที่ 17. ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริมของพีช มีจำนวนเซลล์ 6.0×10^8 CFU/ml และจำนวนสปอร์ 1.20×10^8 CFU/ml สูตรที่ 16 ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริมของพีช มีจำนวนเซลล์ 3.5×10^8 CFU/ml และจำนวนสปอร์ 1.40×10^8 CFU/ml

ในส่วนของสูตรอาหารอื่นๆ คือ สูตรที่ 6 นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย มีจำนวนเซลล์ 4.5×10^8 CFU/ml และจำนวนสปอร์ 5.1×10^7 CFU/ml สูตรที่ 14. ซุปก้อนสูตรไก่ มีจำนวนเซลล์ 7.7×10^7 CFU/ml และจำนวนสปอร์ 1.1×10^7 CFU/ml สูตรที่ 15. ซุปก้อนสูตรเนื้อ มีจำนวนเซลล์ 6.3×10^7 CFU/ml และจำนวนสปอร์ 5.6×10^7 CFU/ml สูตรที่ 4. นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย มีจำนวนเซลล์ 5.1×10^7 CFU/ml และจำนวนสปอร์ 5.0×10^7 CFU/ml สูตรที่ 3. นมถั่วเหลือง+ตับไก่+กากน้ำตาล มีจำนวนเซลล์ 5.0×10^7 CFU/ml และจำนวนสปอร์ 5.0×10^7 CFU/ml สูตรที่ 10. อาหารแมว+นมผง มีจำนวนเซลล์ 2.5×10^7 CFU/ml และจำนวนสปอร์ 1.5×10^7 CFU/ml สูตรที่ 13. ซุปก้อนสูตรหมู มีจำนวนเซลล์ 2.3×10^7 CFU/ml และจำนวนสปอร์ 1.7×10^7 CFU/ml สูตรที่ 7 นมถั่วเหลือง+นมผงเต้าหู้+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย พบจำนวนเซลล์ 1.1×10^7 CFU/ml และจำนวนสปอร์ 1.8×10^8 CFU/ml สูตรที่ 8. นมวัว+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย มีจำนวนเซลล์ 5.5×10^8 CFU/ml และไม่พบจำนวนสปอร์ สูตรที่ 1. นมถั่วเหลือง+อาหารแมว ไม่พบจำนวนเซลล์และจำนวนสปอร์ 1.8×10^8 CFU/ml

สูตรที่ 2. นมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข ไม่พบจำนวนเซลล์และจำนวนสปอร์ 5.7×10^7 CFU/ml สูตรที่ 9. นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย ไม่พบจำนวนเซลล์และจำนวนสปอร์ 5.0×10^7 CFU/ml

เมื่อพิจารณาจากจำนวนเซลล์และสปอร์ที่ผลิตได้ มาเทียบกับวิธีการมาตรฐาน พบว่าสูตรที่ 16 ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริมของพืช สูตรที่ 17 ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริมของพืชและสูตรที่ 18 ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริมของพืช มีจำนวนเซลล์และสปอร์ในปริมาณที่ใกล้เคียง อีกทั้งพบว่าไม่มีปัญหาเรื่องการปนเปื้อนระหว่างการเพาะเลี้ยงและการเกิดฟองด้วย ทั้งยังสามารถเตรียมสูตรอาหารได้ง่าย ส่วนผสมสามารถหาได้ในท้องตลาดทั่วไป

นอกจากนี้ได้ทำการตรวจนับผลึกโปรตีนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในปริมาณ 5 ไมโครลิตร ทั้งหมด 20 สูตรอาหาร (ตารางที่ 3) พบว่า สูตรที่ 20. Nutrient broth พบผลึกโปรตีนจำนวน 179 ผลึก ซึ่งพบมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lisansky และคณะ (1993) พบว่าปีที่สร้างผลึกโปรตีนในระยะ Sporulation phase และสิ้นสุดในระยะสุดท้ายของการสร้างสปอร์ ผนังของ sporangium จะแตกออกปลดปล่อยผลึกโปรตีน ซึ่งสภาวะ Sporulation phase นี้จะเกิดขึ้นเมื่อ สภาวะที่มีอาหารสมบูรณ์ เช่น ในอาหาร Nutrient broth การสร้างผลึกโปรตีนจะเกิดขึ้นภายในระยะเวลาเพียง 24 ชั่วโมง หลังจากเริ่มเลี้ยงเชื้อและใช้เวลาในการปลดปล่อยโปรตีนออกจาก sporangium 24-48 ชั่วโมง

รองลงมา คือ สูตรที่ 17. ซุปก้อนสูตรไก่+หัวธาตุอาหาร สูตรที่ 18. ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริมของพืช สูตรที่ 16 ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริมของพืช สูตรที่ 12. น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียมและสูตรที่ 7. นมถั่วเหลือง+นมผงเด็ก+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย พบผลึกโปรตีนจำนวน 7, 6, 5, 2 และ 2 ผลึก ตามลำดับ

ในส่วนของสูตรที่ 1. นมถั่วเหลือง+อาหารแมว สูตรที่ 11. อาหารแมว+นมข้นหวาน สูตรที่ 9. นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 6. นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 14. ซุปก้อนสูตรไก่ และสูตรที่ 15. ซุปก้อนสูตรเนื้อ พบผลึกโปรตีนจำนวน 1 ผลึกในทุกสูตร และในส่วนของสูตรอาหาร สูตรที่ 2. นำนมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข สูตรที่ 3. นมถั่วเหลือง+ตับไก่+กากน้ำตาล สูตรที่ 4. นมถั่วเหลือง+นมข้นหวานหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 5. นมถั่วเหลือง+นมข้นหวานหวาน+อาหารหมา+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 8. นมวัว+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 10. อาหารแมว+ นมผง สูตรที่ 13. ซุปก้อนสูตรหมู สูตรที่ 19. น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง ไม่พบผลึกโปรตีนในทุกสูตรตามลำดับ

สำหรับต้นทุนของสูตรอาหารแต่ละชนิด ทั้งหมด 20 สูตร (ตารางที่ 4) ในปริมาตร 200 มิลลิลิตร พบว่าสูตรที่ 20.Nutrient broth มีต้นทุน 10.4 บาท ซึ่งมีราคาสูงกว่า สูตรที่ 13.ซุปก้อนสูตรหมู สูตรที่ 14. ซุปก้อนสูตรไก่ สูตรที่ 15. ซุปก้อนสูตรเนื้อ สูตรที่ 19. น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง สูตรที่ 16 ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริมของพืช สูตรที่ 17. ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริมของพืช สูตรที่ 18. ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริมของพืช สูตรที่ 2. นมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข มีต้นทุน 2.8, 2.8, 3, 4, 5.9, 5.9, 6.3 และ 9.44 บาทตามลำดับ

ในส่วนของสูตรอาหารที่มีราคาแพงกว่า NB คือ สูตรที่ 12. น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม สูตรที่ 3. นมถั่วเหลือง+ตับไก่+กากน้ำตาล สูตรที่ 11. อาหารแมว+นมข้นหวาน สูตรที่ 1. นมถั่วเหลือง+อาหารแมว สูตรที่ 5. นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารหมา+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 9. นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 4. นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 6. นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย+เกลือ สูตรที่ 8.

น้ำมันวัว+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ 7. นมถั่วเหลือง+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย และสูตรที่ 10. อาหารแมว+นมผง มีต้นทุน 11.87 12.08 12.46 12.81 12.85 14.94 16.22 19.46 บาท 38.8 40.08 43.7 บาท ตามลำดับ

ทั้งนี้จากการศึกษาของ Wuhan (1998) ได้แนะนำว่าการผลิตขยายเชื้อ *B. thuringiensis* มีเรื่องที่ต้องคำนึงถึง 3 ข้อใหญ่ คือ 1. อาหารที่นำมาใช้ในการผลิตสามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่น 2. ราคาถูกและ 3. ความสามารถของเชื้อ *B. thuringiensis* ที่จะใช้สารอาหารชนิดนั้นๆได้อย่างเหมาะสม ซึ่งต้นทุนในการผลิตสูตรอาหารอย่างง่ายหลายสูตร มีราคาต่ำกว่าวิธีมาตรฐานเกือบ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่มีเพียง 3 สูตร ที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันด้วย คือ 1. ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริมของพืช 2. ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริมของพืช 3. ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริมของพืช พบว่ามีต้นทุนที่ 5.9, 5.9 และ 6.3 บาทต่อสองร้อย มิลลิลิตร ในขณะที่วิธีมาตรฐานมีต้นทุนสูงถึง 10.4 บาทต่อสองร้อยมิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* ที่เจริญในสูตรอาหารต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ

ทำการศึกษา *B. thuringiensis* ที่เจริญในสูตรอาหารต่างๆ ทั้งหมด 20 สูตร เมื่อนำทั้งผลการวิเคราะห์ธาตุอาหาร จำนวนเซลล์ สปอร์ และต้นทุน มาเปรียบเทียบกับกันแล้ว พบว่า สูตรที่ 16 ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริมของพืช สูตรที่ 17 ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริมของพืช และสูตรที่ 18 ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริมของพืช ทั้งหมด 3 สูตรอาหารที่คาดว่าจะสามารถเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* ได้เพราะมีธาตุอาหารที่มีปริมาณเหมาะสม มีจำนวนเซลล์และจำนวนสปอร์พบมากที่สุด จึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนผีเสื้อศัตรูพืชในอัตรา เชื้อ 1 ส่วนและน้ำ 1 ส่วน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาการเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* สายพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตรต่อไป

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. thuringiensis* ที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารอย่างง่ายกับหนอนกระทู้ผัก วัย 2 มีประสิทธิภาพต่ำกว่าเชื้อ *B. thuringiensis* ที่ผลิตจากสูตรอาหารมาตรฐาน โดยเมื่อครบ 7 วัน พบว่าสูตร Nutrient broth พบหนอนกระทู้ผักตายเฉลี่ย 6.3 ตัวต่อกรรมวิธีตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 16 ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริมของพืช สูตรที่ 17 ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริมของพืชและกรรมวิธีควบคุมพบหนอนกระทู้ผักตายเฉลี่ย 0.3, 1 และ 0 ตัวตามลำดับ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรที่ 18 ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริมของพืชพบหนอนกระทู้ผักตายเฉลี่ย 4.3 ตัวตามลำดับ(ตารางที่ 5)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. thuringiensis* ที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารอย่างง่ายกับหนอนกระทู้หอม วัย 2 มีประสิทธิภาพต่ำกว่าเชื้อ *B. thuringiensis* ที่ผลิตจากสูตรอาหารมาตรฐาน โดยเมื่อครบ 7 วัน พบว่าสูตร Nutrient broth ทำให้หนอนกระทู้หอมตายมากที่สุดเฉลี่ย 8 ตัวต่อกรรมวิธี ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 16 ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริมของพืช สูตรที่ 18 ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริมของพืช และกรรมวิธีควบคุมพบหนอนกระทู้หอมตายเฉลี่ย 1.6, 1.6 และ 0 ตัวต่อกรรมวิธีตามลำดับและยังแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 17 ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริมของพืชพบหนอนกระทู้หอมตายเฉลี่ย 2.6 ตัวต่อกรรมวิธีตามลำดับ(ตารางที่ 6)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. thuringiensis* ที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารอย่างง่ายกับหนอนเจาะสมอฝ้าย วัย 2 มีประสิทธิภาพเท่ากับเชื้อ *B. thuringiensis* ที่ผลิตจากสูตรอาหารมาตรฐาน โดยเมื่อครบ 7 วัน พบว่าสูตร Nutrient broth และสูตรที่ 17 ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริมของพืชทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตายมากที่สุดเฉลี่ย 6.6 และ 6.3 ตัวต่อกรรมวิธีตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 16 ซุปก้อนสูตรหมู+

ธาตุอาหารเสริมของพืช สูตรที่ 18 ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารและ
กรรมวิธีควบคุม พบหนอนเจาะสมอฝ้ายตายเฉลี่ย 2.3, 4 และ 1 ตัว
ต่อกรรมวิธีตามลำดับ (ตารางที่ 7)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของเชื้อ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* สายพันธุ์ของกรมวิชาการ
เกษตรที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารอย่างง่ายกับหนอน 3 ชนิด
ให้ผลที่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าเชื้อ *B. thuringiensis* จะมี
ประสิทธิภาพต่ำกว่าเชื้อที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรมาตรฐาน แต่สูตร
มาตรฐานก็ไม่สามารถควบคุมหนอนทั้ง 3 ชนิดได้เกิน 80
เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้มีสาเหตุหลากหลายสาเหตุ เช่น พฤติกรรมการ
กินอาหารของแมลงมีผลต่อการได้รับเชื้อ *B. thuringiensis*
(Berdegue และคณะ 1996) พบว่าในบางกรณีสูตรหรือผลึก
โปรตีนเป็นสารไล่แมลง โดยทดสอบกับหนอนกระทู้หอม ใช้
หนอนแรกฟักและหนอนวัย 3 พบว่าหนอนกระทู้หอมหลีกเลี่ยง
หรือไม่กินอาหารที่ผสมกับบีทีทำให้หนอนไม่ตายได้ หรือใน
สาเหตุที่ปัจจัยของพืชหรืออาหารมีต่อแมลง ซึ่งมีหลายการ
ทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงอาหารของหนอนผีเสื้อส่งผลต่อ
การเข้าทำลายของบีทีด้วย เช่น จริยา 2554 ได้อ้างถึงงานวิจัย
ของ Apple และ Schutz, 1994 ว่าหนอนผีเสื้อยิบซี
Lymantria dispar พบว่าเมื่อใช้ *B. thuringiensis* subsp.
kurstaki หลายๆสูตร ความเป็นพิษของบีทีที่มีต่อผีเสื้อยิบซินั้น
จะขึ้นอยู่กับพืชอาหารที่ใช้ทดสอบด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ Hwang
และคณะ (1995) เมื่อทดสอบ *B. thuringiensis* subsp.
kurstaki ของผลิตภัณฑ์ Foray 48B ให้กินใบพืชที่ต่างชนิดกัน
ทำให้หนอนยิบซีอ่อนแอต่อบีทีแตกต่างกันได้ถึง 100 เท่า
ถึงแม้ว่าสูตรอาหารทั้ง 4 กรรมวิธีมีปริมาณเซลล์และสปอร์
ใกล้เคียงกัน แต่มีประสิทธิภาพต่อหนอนผีเสื้อแตกต่างกันอาจ
เนื่องมาจากสารพิษเอ็กโซทอกซิน ซึ่งผลิตในระหว่างขบวนการ
เจริญเติบโตในสูตรอาหารมาตรฐาน(NB) สามารถเพาะเลี้ยงได้
ดีกว่าทำให้มีสารพิษนี้มากกว่าจึงไปเสริมพิษของสปอร์และผลึก

โปรตีนที่มีปริมาณใกล้เคียงกันได้ อีกทั้งการใช้ *B. thuringiensis* สายพันธุ์เดียวกันอาจพบความแตกต่างของประสิทธิภาพการเข้าทำลาย เนื่องจากแมลงแต่ละชนิดอ่อนแอต่อส่วนประกอบของเชื้อต่างกันขึ้นอยู่กับ อายุ ความแข็งแรงของแมลง พฤติกรรมการกินอาหารของแมลง นิเวศวิทยาของแมลง ซึ่งมีความสัมพันธ์กันกับความเข้มข้นของบีทีที่ใช้ ระดับการได้รับเชื้อบีทีของแมลง สภาพการเพาะเลี้ยง อัตราส่วนระหว่างสปอร์และผลึกโปรตีน หรือทุกๆปัจจัยรวมกัน

12. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ การเพาะขยายเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* สายพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตรเพื่อควบคุมแมลง ศัตรูพืชด้วยอาหารสูตรต่างๆ จำนวน 20 ชนิด พบว่ามีสูตรอาหารอย่างง่าย 3 ชนิดที่คาดว่าจะสามารถเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* ได้ คือ 1. สูตรซูปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริมของพืช 2. สูตรซูปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริมของพืช. 3. สูตรซูปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริมของพืช เมื่อนำเชื้อ *B. thuringiensis* ที่ผลิตได้จากสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร ทำการทดสอบประสิทธิภาพเปรียบเทียบกับอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ NB (Nutrient Broth) โดยทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนเจาะสมอฝ้ายในห้องปฏิบัติการพบว่าในวันที่ 7 ของการทดลองมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3.3-60, 16.6-80 และ 23.3-66.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นทั้ง 3 สูตรนี้ จึงควรนำไปพัฒนาให้มีส่วนผสมของสารอาหารคาร์บอน ไนโตรเจนและโพแทสเซียม ในอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตพร้อมกับการผลิตผลึกโปรตีน นอกจากนี้ยังต้องมีการพิจารณาและแร่ธาตุต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบีทีและต้องมีการควบคุมอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่างหรือพีเอช (pH) ของอาหาร อีกทั้งการถ่ายเทอากาศภายในถังหมักเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง

13. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ นักวิชาการ ผู้เกี่ยวข้องและเกษตรกรสามารถนำข้อมูลจากงานวิจัยชิ้นนี้ไปเป็นแนวทาง เป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาอาหารหรือพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* อย่างง่ายให้แก่เกษตรกรผู้สนใจในการผลิตขยาย
14. คำขอบคุณ ขอขอบคุณผู้ร่วมงานของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช นางสาวอัจฉริยา ธาณีและนายสมศักดิ์ แสงพระจันทร์ สำหรับความช่วยเหลือและการเตรียมวัสดุการทดลองรวมถึงความร่วมมือและช่วยปฏิบัติงานทดลองครั้งนี้เป็นอย่างยิ่ง
15. เอกสารอ้างอิง จริยา จันทรไพแสง. 2554. ปีที่: *Bacillus thuringiensis* จุลินทรีย์ควบคุมแมลง. นิเวศกรมดาการพิมพ์(ประเทศไทย). กรุงเทพมหานคร. อ้างถึง Apple, H.M. and J.c. Schultz. 1994 Oak tannins reduce effectiveness of Thuricide (*Bacillus thuringiensis*) in the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). J. Econ. Entomol. 87:1736-1742.
- ปทุมพร ฉิมอเนก จริยา จันทรไพแสง. 2541. การผลิต *Bacillus thuringiensis* subsp.kurstaki เพื่อใช้ควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Heliothis armigera* Hubner) หน้า 37-50 ใน: รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทนอดทนวิจัย มก. ประจำปี 2541 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ไมตรี ชูรอด. 2539. การปรับปรุงวิธีการแยก *Bacillus thuringiensis*. สงขลา : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี อิศเรสเทียนทัต ภัทรพร สรรพนุเคราะห์. 2555. ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตด้วยวิธีต่างๆ. หน้า 765-771 ใน:

รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัย

พัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร.

สุรางค์ สุธิราวุธ. 2561. การตรวจสอบปริมาณและชนิด

จุลินทรีย์ที่ใช้ทางการเกษตรจากผลิตภัณฑ์นำเข้า

(ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล

<http://www.doa.go.th/biotech/pdf->

[ktk/i_book_1.pdf](http://www.doa.go.th/biotech/pdf-) (8 สิงหาคม 2561)

อัจฉรา ตันติโชค. 2534. แบคทีเรียควบคุมแมลงศัตรูพืช. หน้า

148-166. ใน: เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลง

ศัตรูพืชโดยชีววิธี. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการ

เกษตร.

อิศเรศ เทียนหัตถ์ อัจฉรา ตันติโชค สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี. 2553.

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย

Bacillus thuringiensis ที่ผลิตด้วยวิธีการมาตรฐาน

และวิธีการผลิตแบบพื้นบ้าน. หน้า 801-809 ใน:

รายงานประจำปี 2553 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขา

พืช. กรมวิชาการเกษตร.

Abdel-Hameed., G. Carlberg and O.M. El-Tayeb

(1990). Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14

strains isolated from Egypt.III. Selection of

media for delta – endotoxins production

.World. J. Microbiol. Biotech., 6: 313-317

Berdegue, M., Trumble, J.T. and W.J. Moar. 1996.

Effect of CryIc toxin from *Bacillus thuringiensis*

on larval feeding behavior of *spodoptera*

exigua. Entomol. Exp. Appl. 80: 389-401.

De Barjac, H., and E. Frachon. 1990. Classification of

Bacillus thuringiensis strains. Entomophaga

35:233-240.

Desai, S.Y and Y.I. Shethna (1991). Production and formulation of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis and *B. sphaericus*. Indian. J. Med. Res., 93: 318-323

Dulmage, H. T. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their Potential for pest control. Page. 193-222. In: H.D. Burges (ed.) Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press, London.

Hwang, S.Y., Lindroth, R.L., Montgomery, M.E. and K.S. Shields. 1995. Aspen leaf quality affects gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. J.Econ.entomol. 88: 278-282.

Lisansky S. G., Quinlan R., Tassoni G., 1993- The *Bacillus thuringiensis* Production Handbook, pp. 1-124.

Mummigati, S.G and A.N. Raghunathan (1990). Influence of media composition and the production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol., 55: 147-151.

Singer, S. and M.H. Rogoff. 1986. Inhibition of growth of *Bacillus thuringiensis* by amino acids in defined media. J. Invert. Pathol. 12:98-104.

Sothorn Prasertphon. 1975. Development of production and application of *Bacillus thuringiensis* Berliner in Thailand. Plant protection service technical bulletin No.34.

Wuhan. 1998. B.thuringiensis Production and Application, pp.17-28. In The Third international training course. B.thuringiensis Research and Development center, Hubei Academy of Agricultural Sciences, China

16. ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ธาตุ N K C และ pH ในสูตรอาหารต่างๆ

สูตรอาหาร		C (Mg/L)	N (Mg/L)	K (Mg/L)	pH
1	นมถั่วเหลือง+อาหารแมว	293	1,695	742	6.86
2	นมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข	333	1,761	704	6.67
3	นมถั่วเหลือง+ตับไก่+กากน้ำตาล	272	2,570	5,720	4.94
4	นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	9.62	4,493	1,998	6.52
5	นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารหมา+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	10.51	3,408	1,668	6.66
6	นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย+เกลือ	10.87	5,093	2,111	6.27
7	นมถั่วเหลือง+นมผงเด็ก+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	18.17	3,484	2,200	6.37
8	นมวัว+นมผงเด็ก+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	9.98	2,589	1,950	6.46
9	นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	9.26	5,236	2,503	6.46
10	อาหารแมว+นมผงเด็ก	582	3,265	1,347	6.28
11	อาหารแมว+นมข้นหวาน	391	1,295	1,120	6.05
12	น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม	503	2,580	1,086	5.42
13	ซูปก้อนสูตรหมู	1.48	593	78	4.58
14	ซูปก้อนสูตรไก่	1.19	880	2	5.69
15	ซูปก้อนสูตรเนื้อ	2.96	4,471	170	5.74
16	ซูปก้อนสูตรหมู+หัวธาตุอาหารเสริม	4.54	521	1,038	4.27
17	ซูปก้อนสูตรไก่+หัวธาตุอาหารเสริม	4.35	790	1,113	4.67
18	ซูปก้อนสูตรเนื้อ+หัวธาตุอาหารเสริม	5.07	2,550	1,137	4.67
19	น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง	ND	1110.6	7,814	6.04
20	Nutrient Broth	0.21	1,029	213	6.69

ตารางที่ 2 จำนวนโคโลนีของ *Bacillus thuringiensis* หลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงชนิดต่างๆ โดยนับด้วยวิธีการ Total cell count dilution ten-fold count บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง Nutrient Agar (NA)

สูตรอาหาร(200 มิลลิลิตร)		ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนี ^{1/} (CFU/ml)
1	นมถั่วเหลือง+อาหารแมว	1.88x10 ⁷
2	นมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข	2.77x10 ⁶
3	นมถั่วเหลือง+ตับไก่+กากน้ำตาล	1.20x10 ⁷
4	นมถั่วเหลือง+นมข้น+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	2.28x10 ⁷
5	นมถั่วเหลือง+นมข้น+อาหารหมา+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	2.09x10 ⁶
6	นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้น+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย+เกลือ	2.04x10 ⁷
7	นมถั่วเหลือง+นมผงเด็ก+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	1.65x10 ⁷
8	น้ำนมวัว+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	1.61x10 ⁵
9	น้ำนมวัว+นมข้น+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	6.30x10 ⁵
10	อาหารแมว+นมผง	1.23x10 ⁷
11	อาหารแมว+นมข้นหวาน	2.32x10 ⁷
12	น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม	3.87x10 ⁷
13	ซูปก้อนสูตรหมู	1.43x10 ⁸
14	ซูปก้อนสูตรไก่	2.00x10 ⁸
15	ซูปก้อนสูตรเนื้อ	2.10x10 ⁸
16	ซูปก้อนสูตรหมู+หัวธาตุอาหารเสริม	1.70x10 ⁸
17	ซูปก้อนสูตรไก่+หัวธาตุอาหารเสริม	3.30x10 ⁸
18	ซูปก้อนสูตรเนื้อ+หัวธาตุอาหารเสริม	2.60x10 ⁸
19	น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง	2.46x10 ⁷
20	Nutrient broth	1.73x10 ⁹

^{1/} ค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 2 ครั้ง ในแต่ละครั้ง เจือจางที่ระดับ -5,-6,-7 ทำ 3 ซ้ำซ้ำละ 3 จานเพลท

ตารางที่ 3 จำนวนเซลล์ สปอร์และผลึกโปรตีน หลังจากเพาะเลี้ยงหลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงชนิดต่างๆ โดยนับด้วยวิธีการ Total count ด้วย Haemocytometer

	สูตรอาหาร(200 มิลลิลิตร)	จำนวนเซลล์ (cell/ml)	จำนวนสปอร์ (spore/ml)	จำนวนผลึก โปรตีน (ต่อ5ไมโครลิตร)
1	นมถั่วเหลือง+อาหารแมว	-	1.8×10^8	1
2	นมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข	-	5.7×10^7	-
3	นมถั่วเหลือง+ตับไก่+กากน้ำตาล	5.0×10^7	5.0×10^7	-
4	นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	5.1×10^7	5.0×10^7	-
5	นมถั่วเหลือง+นมข้นหวาน+อาหารหมา+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	-	-	-
6	นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้น+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	4.5×10^8	5.1×10^7	1
7	นมถั่วเหลือง+นมผงเด็ก+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	1.1×10^7	1.8×10^8	2
8	นมวัว+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	5.5×10^8	-	-
9	นมวัว+นมข้นหวาน+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	-	5.0×10^7	1
10	อาหารแมว+นมผง	6.5×10^7	1.5×10^7	-
11	อาหารแมว+นมข้นหวาน	-	-	1
12	น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม	-	-	2
13	ซูปก้อนสูตรหมู	2.3×10^7	1.7×10^7	-
14	ซูปก้อนสูตรไก่	7.7×10^7	1.1×10^7	1
15	ซูปก้อนสูตรเนื้อ	6.3×10^7	5.6×10^7	1
16	ซูปก้อนสูตรหมู+หัวธาตุอาหารเสริม	3.5×10^8	1.4×10^8	5
17	ซูปก้อนสูตรไก่+หัวธาตุอาหารเสริม	6.0×10^8	1.2×10^8	7
18	ซูปก้อนสูตรเนื้อ+หัวธาตุอาหารเสริม	4.5×10^8	5.5×10^8	6
19	น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง	-	-	-
20	Nutrient broth	7.2×10^8	1.5×10^9	179

ตารางที่ 4 ต้นทุนการผลิตสูตรอาหารอย่างง่ายในปริมาตร 200 มิลลิลิตร

	สูตรอาหาร	ต้นทุน(บาท)
1	นมถั่วเหลือง+อาหารแมว	12.81
2	นมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข	9.44
3	นมถั่วเหลือง+ตับไก่+กากน้ำตาล	12.08
4	นมถั่วเหลือง+นมข้น+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	16.22
5	นมถั่วเหลือง+นมข้น+อาหารหมา+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	12.85
6	นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้น+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย+เกลือ	19.46
7	นมถั่วเหลือง+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	40.08
8	นมวัว+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	38.8
9	นมวัว+นมข้น+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	14.94
10	อาหารแมว+นมผง	43.7
11	อาหารแมว+นมข้นหวาน	12.46
12	น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม	11.87
13	ซูปก้อนสูตรหมู	2.8
14	ซูปก้อนสูตรไก่	2.8
15	ซูปก้อนสูตรเนื้อ	3
16	ซูปก้อนสูตรหมู+หัวธาตุอาหารเสริม	5.9
17	ซูปก้อนสูตรไก่+หัวธาตุอาหารเสริม	5.9
18	ซูปก้อนสูตรเนื้อ+หัวธาตุอาหารเสริม	6.3
19	น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง	4
20	Nutrient broth	10.4

ตารางที่ 5 จำนวนและเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักวัย 2 จากแบคทีเรียปีที่ผลิตโดยสูตรอาหารต่างๆ

กรรมวิธี	อัตรา เชื้อ:น้ำ	จำนวนหนอนตายเฉลี่ย ^{1/} (ตัว)				เปอร์เซ็นต์ หนอนตาย (%)
		วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	
ซูปก้อนสูตรหมู+หัวธาตุอาหารเสริม	1:1	0	0c	0b	0.3c	3.3
ซูปก้อนสูตรไก่+หัวธาตุอาหารเสริม	1:1	0.3	0.6c	1b	1c	10.0
ซูปก้อนสูตรเนื้อ+หัวธาตุอาหารเสริม	1:1	0.6	2.6ab	4.3a	4.3b	43.3
Nutrient broth	1:1	1	5a	5.6a	6.3a	60.0
ควบคุม(control)		0	0c	0b	0c	0.0
C.V.(%)		19.7	51.0	40.2	34.7	

^{1/} จำนวนหนอนกระทู้ผักจาก 3 ซ้ำซ้ำละ 10 ตัว

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 6 จำนวนและเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมวัย 2 จากแบคทีเรียปีที่ผลิตโดยสูตรอาหารต่างๆ

กรรมวิธี	อัตรา เชื้อ:น้ำ	จำนวนของหนอนตายเฉลี่ย ^{1/} (ตัว)				เปอร์เซ็นต์ หนอนตาย (%)
		วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	
ซูปก้อนสูตรหมู+หัวธาตุอาหารเสริม	1:1	0.3b	0.6b	1.6b	1.6bc	16.6
ซูปก้อนสูตรไก่+หัวธาตุอาหารเสริม	1:1	0.3b	1.3b	1.6b	2.6b	26.6
ซูปก้อนสูตรเนื้อ+หัวธาตุอาหารเสริม	1:1	0.3b	0.3b	0.6bc	1.6bc	16.6
Nutrient broth	1:1	1.3a	4.6a	7.6a	8a	80.0
ควบคุม(control)		0b	0b	0c	0c	0.0
C.V.(%)		67.1	55.1	37.2	31.4	

^{1/} จำนวนหนอนกระทู้หอมจาก 3 ซ้ำซ้ำละ 10 ตัว

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 7 จำนวนและเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเจาะสมอฝ้ายวัย 2 จากแบคทีเรียปีที่ผลิตโดยสูตรอาหารต่างๆ

กรรมวิธี	อัตรา เชื้อ:น้ำ	จำนวนของหนอนตาย ^{1/} (ตัว)				เปอร์เซ็นต์ หนอนตาย (%)
		วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	
ซูปก้อนสูตรหมู+หัวธาตุอาหารเสริม	1:1	1	1b	1.6b	2.3b	23.3
ซูปก้อนสูตรไก่+หัวธาตุอาหารเสริม	1:1	1.3	3ab	5.6a	6.3a	63.3
ซูปก้อนสูตรเนื้อ+หัวธาตุอาหารเสริม	1:1	2.3	2.6ab	3.3b	4b	40.0
Nutrient broth	1:1	1.6	3.3a	5.3a	6.6a	66.6
ควบคุม(control)		1	1b	1b	1b	10.0
C.V.(%)		36.7	27.06	22.07	29.1	

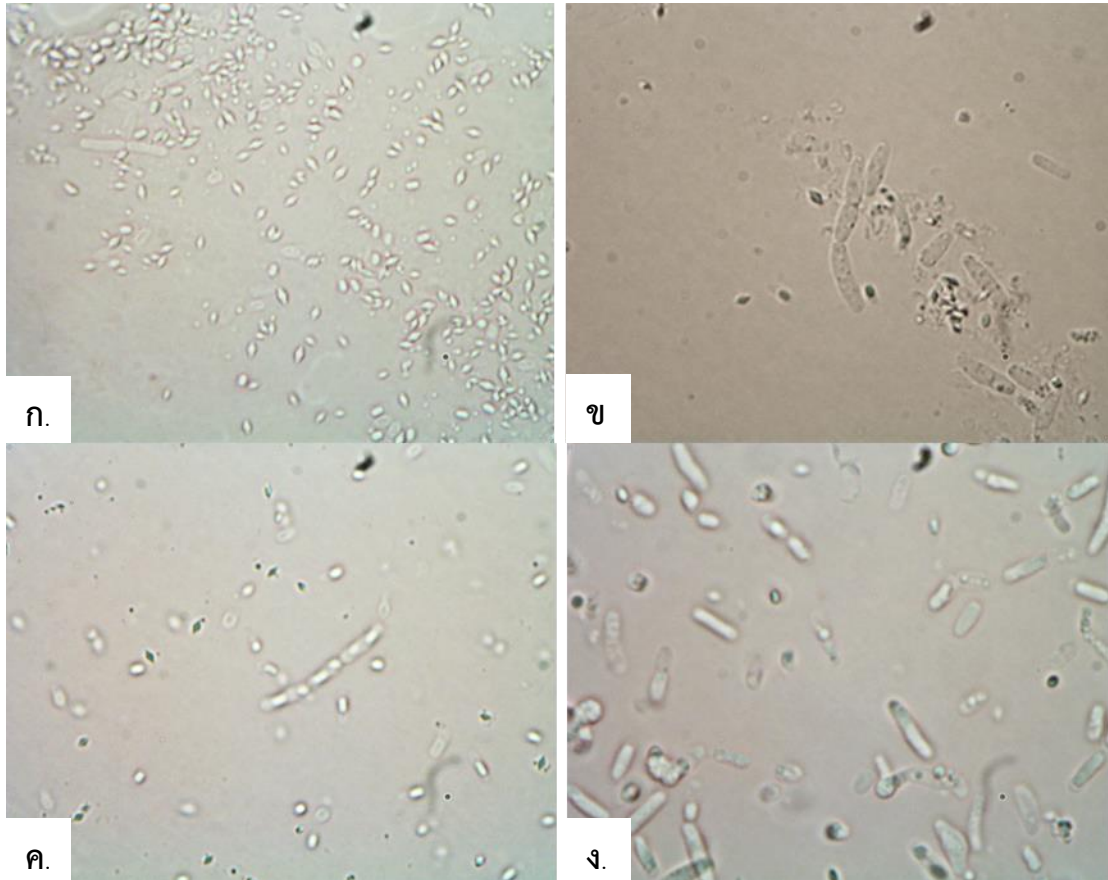
- 1/ จำนวนหนอนเจาะสมอฝ้ายจาก 3 ซ้ำซ้ำละ 10 ตัว
- 2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบที่นำมาทำเป็นสูตรอาหารอย่างง่ายทั้ง 27 ชนิด



ภาพที่ 2 สูตรอาหารอย่างง่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* สายพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตร แล้วเป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 3 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ สปอร์ และผลึกโปรตีนของ *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* สายพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตรที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารต่างๆ ด้วยกล้อง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

- ก. เซลล์ สปอร์ และผลึกโปรตีนที่เพาะเลี้ยงด้วย Nutrient broth
- ข. เซลล์ สปอร์ และผลึกโปรตีนที่เพาะเลี้ยงด้วย อาหารสูตรไก่+หัวธัญอาหารเสริม
- ค. เซลล์ สปอร์ และผลึกโปรตีนที่เพาะเลี้ยงด้วย อาหารสูตรเนื้อ+หัวธัญอาหารเสริม
- ง. เซลล์ สปอร์ และผลึกโปรตีนที่เพาะเลี้ยงด้วย อาหารสูตรหมู+หัวธัญอาหารเสริม