รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

๑. ชุดโครงการวิจัย : อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์อย่างยั่งยืน

๒. โครงการวิจัย : **การอนุรักษ์จุลินทรีย์ทางการเกษตรเพื่อใช้ประโยชน์**

๓. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : เทคนิคการเก็บรักษาบีทีเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Conservation and Utilization of *Bacillus thuringiensis*

๔. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ
สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นางสาว**ภรณี สว่างศรี**
สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด
สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

๕. บทคัดย่อ

ในการอนุรักษ์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ได้ทำการเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิดของบีที *(B.thuringiensis)* จากดินในภูมิภาคต่างๆทั่วประเทศ พบว่าได้เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน ๕๗ ไอโซเลท จากการนำเชื้อ *B.thuringiensis* ตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าแบนที่ได้ส่วนใหญ่จะผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง ๒๕-๔๘ กิโลดาลตัน จากการศึกษาผลของการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย ในระยะที่๒ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น ๑๐^{๙} มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตายเฉลี่ย ๑๐๐ เปอร์เซ็น ในวันที่ ๓ คือ ๗๒ ชั่วโมง และชุดควบคุมไม่มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตาย โดยลักษณะของตัวหนอนที่ตาย จะมีสีลำตัวเป็นสีดำ ลำตัวของตัวหนอนจะงอแข็ง วางตัวตะแครงข้าง และไม่เคลื่อนไหวอีกต่อไป การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย (Cotton bollworm) ในห้องปฏิบัติการโดยสุ่มทดสอบกับ *B. thuringiensis* ๒๐ ไอโซเลท จากการเก็บรักษาในกลีเซอรอล ๔๐ % ที่อุณหภูมิ ๔ °C ,-๓๐ °C, -๘๐ °C เป็นระยะเวลา ๓, ๖ และ ๑๒ เดือน พบว่า *B. thuringiensis* ทั้ง ๒๐ ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนเจาะสมอฝ้ายได้

๖. คำนำ

แบคทีเรีย *B. thuringiensis* ควบคุมแมลง ได้มีการค้นพบแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เป็นครั้งแรกราวศตวรรษที่ ๒๐ โดย Ishiwata นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น โดยแยกเชื้อนี้ได้จากหนอนไหม (*Bombyx mori*) ที่เป็นโรค และตั้งชื่อแบคทีเรียนี้ว่า *Bacillus sotto* ต่อมาพบแบคทีเรียที่สร้างสปอร์จาก mediteranean flour moth (*Anagesta kueniellia*) ได้มีการตั้งชื่อแบคทีเรียชนิดนี้ว่า *Bacillus thuringiensis* ตามชื่อเมือง Thuringen แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* จัดจำแนกอยู่ใน Family Bacillaceae และ genus *Bacillus* เป็นกลุ่มของแบคทีเรียพวกที่สร้างสปอร์ได้ ติดสีแกรมบวก ต้องการออกซิเจน ให้ผลของปฏิกิริยา catalase เป็นผลบวก และให้ผลของปฏิกิริยา oxidase เป็นผลลบ ลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) กว้าง ๑.๐-๑.๒ ไมโครเมตร ยาว ๓.๐-๕.๐ ไมโครเมตร โคโลนีค่อนข้างใหญ่ (๕.๐-๑๐.๐ มิลลิเมตร) ลักษณะกลม บางชนิดรูปร่างไม่แน่นอน ในระยะการออกสปอร์ *B. thuringiensis* หลายๆ สายพันธุ์จะผลิตโปรตีนผลึก (proteinaceous inclusions) พร้อมกับโปรตีนคริสตัล (Crystal, Cry toxin) ซึ่งเป็น ประเภท δ-endotoxins โปรตีนนี้เองที่มีฤทธิ์เป็นสารกำจัดแมลง บีทีท็อกซินหรือครายท็อกซิน (Bt toxin หรือ Cry toxin) เป็นสารฆ่าแมลงที่ไม่มีอันตรายต่อมนุษย์ เนื่องจากว่าบีทีจะทำงานในระบบกระเพาะซึ่งเป็นเบส ซึ่งกระเพาะแบบนี้ไม่พบในกลุ่มสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังเช่นมนุษย์ ดังนั้น จึงไม่มีอันตรายต่อสัตว์เลี้ยงทั่วไปและมนุษย์ ในปัจจุบัน มีบีทีท็อกซินอยู่ทั้งหมด ๕๗ ชนิด แต่ละชนิดมีผลต่อแมลงแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น Cry๑Aa และ Cry๒A มีผลต่อผีเสื้อและผีเสื้อกลางคืน ส่วน Cry๕ มีผลต่อแมลงประเภทยุง บีทีจะทำงานก็ต่อเมื่อได้รับการบริโภคเข้าไปในแมลง ดังนั้น จึงมีผลเฉพาะแมลงบางกลุ่ม ทำให้แมลงที่ไม่ใช่ศัตรูพืชไม่ได้ถูกกำจัดไปด้วย จึงเป็นผลดีต่อระบบนิเวศน์ แต่พบว่าผลึกโปรตีนที่เป็นพิษส่วนใหญ่พบในหนอนผีเสื้อ (Lepidoptera) รองลงมาได้แก่ หนอนแมลงวันหรือยุง (Diptera) และด้วง (Coleoptera) (Vidyarthi *et al.*, ๒๐๐๒; Martin *et al.*, ๒๐๑๐)

ปัจจุบันมีการแยก *B. thuringiensis* (บีที) ออกมากกว่า ๕๐,๐๐๐ สายพันธุ์จากแหล่งต่าง ๆ (Sadder *et al.*, ๒๐๐๖) มีรายงานว่าสามารถพบ *B. thuringiensis* ได้ตามแหล่งต่าง ๆ เช่น ดิน ฝุ่นของพืชผลต่าง ๆ ที่เก็บในยุ้งฉาง ซากของแมลง เมล็ดธัญพืช ดินในพื้นที่เกษตร ใต้พุ่มไม้ เป็นต้น *B. thuringiensis* ถูกเริ่มใช้ในรูปแบบของยาฆ่าแมลงในปี ๑๙๕๖ ในชื่อของ Thuricide ในปี ๑๙๙๑ พืชชนิดแรกที่ได้รับการตัดต่อทางพันธุกรรมให้สามารถผลิต *B. thuringiensis* ได้ออกมาจำหน่าย นั่นคือ ฝ้ายที่ผลิตสารพิษของ *B. thuringiensis* ในขณะนี้ มีพืชที่สามารถผลิตสารพิษนี้ปลูกอยู่เกือบ ๒๐๐ ล้านเอเคอร์ทั่วโลก ทั้งนี้ รวมถึงข้าวโพดบีที ผ้าฝ้ายบีที ยาสูบบีที ข้าว และมะเขือเทศ

เชื้อบีทีเป็นเชื้อที่มีความปลอดภัยสูงและไม่เป็นสาเหตุที่ก่ออันตรายต่อมนุษย์ ปลา สัตว์ป่า หรือแมลงที่มีประโยชน์ ซึ่งช่วยในการควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ โดยเข้าทำลายแมลงเมื่อหนอนกินสปอร์และผลึกโปรตีนของเชื้อเข้าสู่กระเพาะอาหาร น้ำย่อยในกระเพาะอาหารของแมลงที่มีความเป็นกรด-ด่าง เหมาะสมกับเชื้อบีที จะย่อยผลึกโปรตีน และบีทีจะปล่อยสารพิษออกมาทำลายผนังกระเพาะอาหารของหนอนศัตรูพืช บีทีผ่านเข้าสู่ช่องว่างลำตัวแมลง ซึ่งมีกระแสเลือดไหลเวียนอยู่ ไปเจริญและเพิ่มปริมาณในเลือด เซลล์ และเนื้อเยื่อของแมลง แมลงจะเป็นอัมพาตและตายเนื่องจากโลหิตเป็นพิษ แมลงที่ได้รับเชื้อบีทีจะไม่อยากกินอาหารหรือหยุดกินอาหาร เชื่องช้า ไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้า ลำตัวเป็นสีน้ำตาลดำ และตายในที่สุด

ในการจำแนกบีทีนิยมใช้เทคนิคการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ๑๖SrDNA genes ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีฐานข้อมูลอ้างอิงจำนวนมากใน GenBank (Ben-Dov *et al.*, ๑๙๙๗) นำมาเปรียบเทียบกันด้วย

โปรแกรมบลาสต์ ก็จะสามารถทราบชนิดของบีทีได้อย่างง่ายดาย (Altschul *et al.*, ๑๙๙๐ อ้างอิงโดย Shishir *et al.*, ๒๐๑๒)
จุลินทรีย์เหล่านี้ นักวิจัยทั่วโลกได้ศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะการพยายามการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ใหม่ๆ จากแหล่งต่างๆ ขึ้นมาใช้ประโยชน์ทั้งในเชิงอนุรักษ์ และพัฒนาต่อยอดให้สามารถนำไปใช้ได้จริง

๗. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

๑. NA agar	๑๐. plate
๒. LB broth	๑๑. หม้อนึ่งความดันไอ (autocave)
๓. หลอดทดลอง (tube)	๑๒. Vortex
๔. ตู้บ่มเชื้อ	๑๓. เครื่อง XCell SureLock™ (NOVEX Mini-Cell)
๕. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow)	๑๔. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน
๖. spectrophotometer	๑๕. กระดาษเซลโลเฟน
๗. microwave	๑๖. ขวดใส่อาหาร (Duran)
๘. pipette	๑๗. เครื่องชั่งสาร
๙. water bart	

- วิธีการ

การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Cotton bollworm*) ในห้องปฏิบัติการ

๑. การเตรียมเชื้อ *B. thuringiensis*

เตรียมเชื้อ *B. thuringiensis* ทุกไอโซเลท โดยเลี้ยงในอาหารแข็ง NA แล้วถ่ายเชื้อ ๑ ไอโซเลท ลงในอาหารเหลว NB ๑๐ ml. เขย่าที่ความเร็วรอบ ๒๒๐ รอบต่อนาที ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑ วัน ให้ได้ความเข้มข้นที่ ๑๐^{๘}-๑๐^{๙} cfu/ml. วัดปริมาณของเซลล์เริ่มต้นของเชื้อที่เตรียมได้ โดยนำมาทำ Serial dilution และ Spread plate บนอาหาร NA จากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนี และนำมาคำนวณหาปริมาณของเซลล์เริ่มต้น ดังสมการ

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย(Cfu/ml)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลง Petri dish}}$$

๒.เตรียมอาหารทดสอบ

ตัดอาหารเทียมให้มีขนาด ๐.๕ x ๐.๕ x ๐.๕ ลูกบาศก์นิ้ว หยดสารละลายเชื้อ *B. thuringiensis* ๑ ml. ลงบนอาหารเทียม และนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

๓.ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย

การทดสอบทำโดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) แต่ละการทดลองทำจำนวน ๖ ซ้ำ ใช้หนอนเจาะสมอฝ้ายระยะที่ ๒ จำนวน ๓๐ ตัว จากนั้นนำอาหารที่เตรียมไว้มาใส่ในถ้วยซึ่งแต่ละถ้วยจะประกอบ ด้วยอาหาร ๑ ชิ้น กับหนอน ๕ ตัว หลังจากนั้นทำการสังเกต

และนับจำนวนหนอนที่ตายที่เวลา ๒๔ ๔๘ และ ๗๒ ชั่วโมง แล้วนำมาคำนวณหาการตายของหนอนอย่างแท้จริง

ดังสมการที่ ๑ วิธีการของ Abbott's formula (๑๙๒๕)

$$p=c+(๑-c)p'$$

เมื่อ c คือ อัตราการตายของหนอนใน control
p'คือ อัตราการตายที่ได้จากการทดลอง
p คือ อัตราการตายอย่างแท้จริง

๓. การสกัดโปรตีนและตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE
- การเตรียมเชื้อ

ลงเชื้อ *B.thuringiensis* ที่คัดเลือกไว้ เลี้ยงลงในอาหาร NA agar ด้วยเทคนิค streak plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๗ °C เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง

- การสกัดโปรตีนและตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE นำโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหาร NA broth ๕ ml. วัดค่า $OD_{๖๐๐}$ ค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer เก็บเชื้อที่เลี้ยงได้ปริมาณ ๒ ml.ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ เวลา ๕ นาที และทิ้งส่วนใส ล้างตะกอนด้วย ๐.๘๕ % NaCl ๔๐๐ µl. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ เวลา ๕ นาที ทำซ้ำ ๒ ครั้ง และทิ้งส่วนใส ละลายด้วย ๕๐ Mm NaOH ๑๐๐ µl. และบ่มทันทีที่อุณหภูมิห้อง ๑๐ นาที ดูด ๖x loading dye ๒๐ µl. เติมลงในหลอด ๑๐๐ µl. ของสารละลายผสมให้เข้ากันและนำไปต้มที่อุณหภูมิ ๙๕ °C เป็นเวลา ๒ นาที นำสารละลายที่ได้ load SDS-PAGE ๓๐ µl. ด้วยเครื่อง XCell SureLock™ (NOVEX Mini-Cell) และใช้ Protein marker ๕ µl. เป็น standard marker

- การตรวจสอบขนาดโปรตีน SDS-PAGE

สารละลายที่ได้ load SDS-PAGE ๓๐ µl. ด้วยเครื่อง XCell SureLock™ (NOVEX Mini-Cell) โดยใช้ ๑X NUPAGE buffer โดยตั้งค่าเครื่องที่ ๑๕๐ โวล์ต ๑๐๐ แอมป์ เวลา ๑ ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ขนาดโปรตีนโดยการนำแผ่นเจลที่ได้ย้อมสี ด้วย Simply Bule Safe Stain ให้ท่วมแผ่นเจล เขย่าทิ้งไว้ ๖๐ นาที และล้างสีออกด้วย Destainning buffer เก็บแผ่นเจลที่ได้ด้วยการตรึงด้วยกระดาษเซลโลเฟน

เทคนิคการเก็บรักษาบีทีเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์

การเก็บรักษาแบคทีเรียบีที ให้คงความมีชีวิตและศักยภาพในการเป็นสารชีวภัณฑ์ โดยเก็บเชื้อแบคทีเรียที่ได้ ๓ แบบ คือ เก็บในอุณหภูมิเยือกแข็ง -๘๐ องศาเซลเซียส เก็บที่อุณหภูมิ -๓๐ องศาเซลเซียส เก็บที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑ ปี โดยนำมาทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี bioassay ทุกๆ ๓ เดือน

ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้ายการทดสอบทำโดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) แต่ละการทดลองทำจำนวน ๓ ซ้ำ แต่ละซ้ำจะใช้หนอนเจาะสมอฝ้ายระยะที่ ๒ จำนวน ๑๐ ตัว ตัดอาหารเทียมให้มีขนาด ๐.๕ x ๐.๕ x ๐.๕ ลูกบาศก์นิ้ว หยดสารละลายเชื้อ *B.thuringiensis* ๑ ml. ลงบนอาหารเทียม หลังจากนั้นทำ

การสังเกต และนับจำนวนหนอนที่ตายที่เวลาต่าง ๆ แล้วนำมาคำนวณหาอัตราการตายของหนอน ตามวิธีการของ Dulmage *et al*. (๑๙๘๑)

อัตราการตายของหนอน (%)

อัตราการตายของหนอนเจาะสมอฝ้าย = (%) จำนวนของหนอนเจาะสมอฝ้ายที่ตาย × ๑๐๐
จำนวนหนอนเจาะสมอฝ้ายที่ทดลอง

- ระยะเวลาเริ่มต้น ปี ๒๕๕๙ ถึงสิ้นสุด ปี ๒๕๖๑
- สถานที่ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

๘. ผลการทดลองและวิจารณ์

- ผลการทดลอง

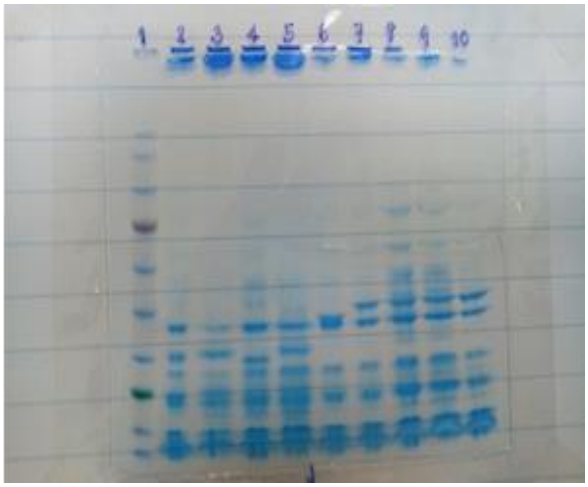
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุม หนอนเจาะสมอฝ้าย

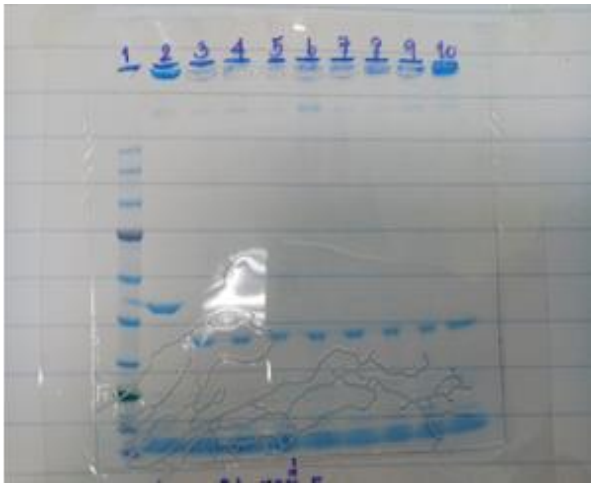
จากการศึกษาผลของการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ที่คัดเลือกได้จำนวน ๕๗ ไอโซเลท ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย ในระยะที่๒ ที่ระดับความเข้มข้น ๑๐^{๘} มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตายเฉลี่ย ๑๐๐ เปอร์เซ็น ในวันที่ ๓ คือ ๗๒ ชั่วโมง และชุดควบคุมไม่มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตาย สังเกตจากลักษณะลำตัวของตัวหนอน คือ ตัวหนอนที่มีชีวิตจะมีลักษณะลำตัวเป็นสีน้ำตาลอ่อน ตัวหนอนวางตัวคว่ำอยู่ตลอดเวลา และเคลื่อนที่ได้ปกติ (ภาพที่ ๑) ส่วนลักษณะของตัวหนอนที่ตาย จะมีสีลำตัวเป็นสีดำ ลำตัวของตัวหนอนจะงอแข็ง วางตัวตะแครงข้าง และไม่เคลื่อนไหวอีกต่อไป (ภาพที่ ๒) ในการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* เบื้องต้นนั้นจะแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ใช้นำมาทดสอบต้องเลี้ยง ให้เจริญจนถึงช่วง Free spore คือเป็นระยะที่สปอร์และผลึกโปรตีนหลุดออกมาจากเซลล์ เพื่อให้เชื้อมีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเกิดพิษกับแมลง นั่นคือผลึกโปรตีนพร้อมที่เปลี่ยนรูปเป็นสารพิษ เมื่อเข้าไปอยู่ในตัวแมลง ซึ่งผลการตายของหนอนที่ชัดเจนเนื่องจากเชื้อ *B. thuringiensis* อยู่ที่ประมาณ ๓ วัน เพราะถ้าใช้เชื้อในการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* ที่ยังไม่อยู่ในช่วง Free spore เมื่อเข้าไปอยู่ในตัวแมลง เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จะใช้เวลาในการเจริญต่ออีกระยะหนึ่งเพื่อทำการพัฒนาให้กลายเป็นสปอร์และผลึกโปรตีนที่สมบูรณ์ทำให้ระยะเวลาที่จะทำให้หนอนตายเพิ่มขึ้นไปอีก ๑-๒ วันหรือหนอนอาจไม่ตายเลย เนื่องจากว่าหนอนมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนวัยมีความแข็งแรงพอที่จะต้านทานต่อเชื้อ *B.thuringiensis* ได้

ภาพที่ ๑ หนอนเจาะสมอฝ้ายระยะที่๒ ที่มีชีวิต **ภาพที่ ๒** หนอนเจาะสมอฝ้ายระยะที่๒ ที่ตาย

การตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS PAGE

จากการนำ BT มาศึกษาการสร้างโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS PAGE โดยใช้ NuPAGE ๔-๑๒% Bis-Tris Gel ของบริษัท NOVEX® by life technologise™ และใช้ protein molecular weight marker เป็น standard marker ซึ่งประกอบไปด้วยแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล ๑๑, ๑๗, ๒๕, ๓๕, ๔๘, ๖๓, ๗๕, ๑๐๐,๑๓๕ และ ๑๘๐ กิโลดาลตัน พบว่า BT ผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง ๒๕-๔๘ กิโลดาลตัน



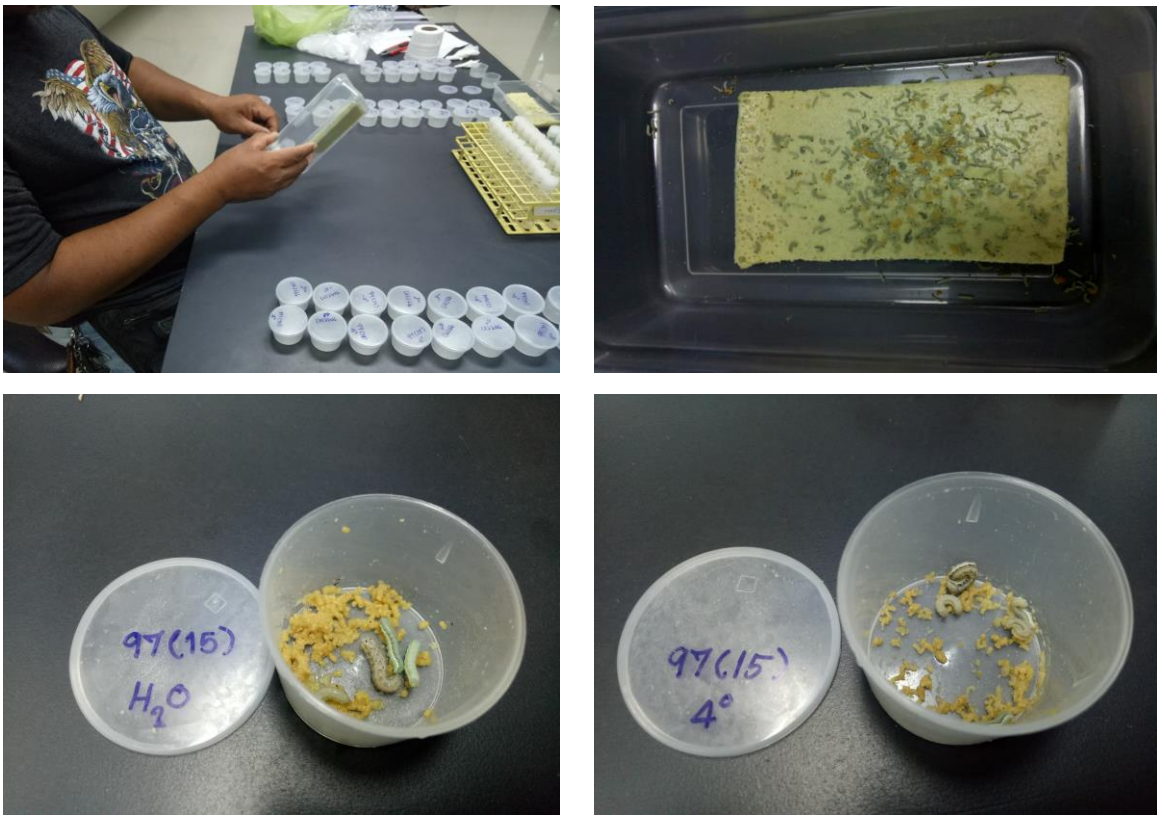


ภาพที่ ๓ ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS PAGE

การศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาบีทีเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ โดยการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย (Cotton bollworm) ในห้องปฏิบัติการโดยสุ่มทดสอบกับ *B. thuringiensis* ๒๐ ไอโซเลท จากการเก็บรักษาในกลีเซอรอล ๔๐ % ที่อุณหภูมิ ๔ °C ,-๓๐ °C, -๘๐ °C เป็นระยะเวลา ๓, ๖ และ ๑๒ เดือน พบว่า *B. thuringiensis* ทั้ง ๒๐ ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนเจาะสมอฝ้ายได้

ตาราง แสดงเปอร์เซ็นต์ (%) อัตราการตายของหนอนเจาะสมอฝ้าย ที่ทดสอบเป็นระยะเวลา ๓ วัน

ลำดับ	Isolate BT	๐ เดือน	๓ เดือน			๖ เดือน			๑๒ เดือน		
			๔ °C	-๓๐°C	-๘๐°C	๔°C	-๓๐°C	-๘๐°C	๔°C	-๓๐°C	-๘๐°C
๑	BT_๐๐๑	๕๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๒	BT_๐๐๒	๔๓	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๓	BT_๐๐๓	๔๗	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๔	BT_๐๐๔	๕๓	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๕	BT_๐๐๕	๓๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๖	BT_๐๐๖	๒๓	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๗	BT_๐๐๗	๒๗	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๘	BT_๐๐๘	๕๓	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๙	BT_๐๐๙	๕๓	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๑๐	BT_๐๑๐	๕๓	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๑๑	BT_๐๑๑	๒๓	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๑๒	BT_๐๑๒	๒๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๑๓	BT_๐๑๓	๕๓	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๑๔	BT_๐๑๔	๒๓	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๑๕	BT_๐๑๕	๔๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๑๖	BT_๐๑๖	๔๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๑๗	BT_๐๑๗	๗	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๑๘	BT_๐๑๘	๗๓	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๑๙	BT_๐๑๙	๒๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐
๒๐	BT_๐๒๐	๑๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐	๐



ภาพที่ ๔ ผลการการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้ายในห้องปฏิบัติการ

๙. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในการอนุรักษ์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ได้ทำการเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิดของบีที *(B.thuringiensis)* จากดินในภูมิภาคต่างๆทั่วประเทศ พบว่าได้เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน ๕๗ ไอโซเลท จากการนำเชื้อ *B.thuringiensis* ตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าแบนที่ได้ส่วนใหญ่จะผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง ๒๕-๔๘ กิโลดาลตัน จากการศึกษาผลของการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย ในระยะที่๒ พบว่า มีเพียงเชื้อ *Bacillus thuringiensis* BT_๐๐๑ ที่ระดับความเข้มข้น ๑๐^{๙} มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตายเฉลี่ย ๑๐๐ เปอร์เซ็น ในวันที่ ๓ คือ ๗๒ ชั่วโมง และชุดควบคุมไม่มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตาย โดยลักษณะของตัวหนอนที่ตาย จะมีสีลำตัวเป็นสีดำ ลำตัวของตัวหนอนจะงอแข็ง วางตัวตะแครงข้าง และไม่เคลื่อนไหวอีกต่อไป ในการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* เบื้องต้นนั้นจะแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ใช้นำมาทดสอบต้องเลี้ยง ให้เจริญจนถึงช่วง Free spore คือเป็นระยะที่สปอร์และผลึกโปรตีนหลุดออกมาจากเซลล์ เพื่อให้เชื้อมีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเกิดพิษกับแมลง นั่นคือผลึกโปรตีนพร้อมที่เปลี่ยนรูปเป็นสารพิษ เมื่อเข้าไปอยู่ในตัวแมลง ซึ่งผลการตายของหนอนที่ชัดเจนเนื่องจากเชื้อ *B. thuringiensis* อยู่ที่ประมาณ ๓ วัน เพราะถ้าใช้เชื้อในการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* ที่ยังไม่อยู่ในช่วง Free spore เมื่อเข้าไปอยู่ในตัวแมลง เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จะใช้เวลาในการเจริญต่ออีกระยะหนึ่งเพื่อทำการพัฒนาให้กลายเป็นสปอร์และผลึกโปรตีนที่สมบูรณ์ทำให้ระยะเวลาที่จะทำให้หนอนตายเพิ่มขึ้นไปอีก ๑-๒ วันหรือหนอนอาจไม่ตายเลย เนื่องจากว่าหนอนมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนวัยมีความแข็งแรงพอที่จะต้านทานต่อเชื้อ *B.thuringiensis* ได้ เทคนิคการเก็บรักษาบีทีเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ ทำการ

ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย (Cotton bollworm) ในห้องปฏิบัติการโดยสุ่มทดสอบกับ *B. thuringiensis* ๒๐ ไอโซเลท จากการเก็บรักษาในกลีเซอรอล ๔๐ % ที่อุณหภูมิ ๔ °C ,-๓๐ °C, -๘๐ °C เป็นระยะเวลา ๓, ๖ และ ๑๒ เดือน พบว่า *B. thuringiensis* ทั้ง ๒๐ ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนเจาะสมอฝ้ายได้ แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาใน กลีเซอรอล ๔๐ % ที่อุณหภูมิ ๔ °C ,-๓๐ °C, -๘๐ °C ลดประสิทธิภาพของเชื้อ *B.thuringiensis* ลงทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนเจาะสมอฝ้ายได้

๑๐. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เช่น ด้านวิชาการ ด้านนโยบาย ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์ ด้านสังคมและชุมชน รวมถึงการเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

หน่วยงานที่นำไปใช้ประโยชน์

- หน่วยงานของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และกระทรวงพลังงาน ได้แก่ กรมส่งเสริมการเกษตร กรมพัฒนาที่ดิน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- สถาบันการศึกษาต่างๆ
- กลุ่มเกษตรกร

๑๑. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ช่วยเหลือให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมปฏิบัติงานด้วย

๑๒. เอกสารอ้างอิง

Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sýnal, R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N. and Margalith, Y. ๑๙๙๗. Extended Screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected Strains of Bacillus thuringiensis. Applied and Environmental Microbiology, ๖๓: ๔๘๘๓-๔๘๙๐.

Martin, P.A., Gundersen, D.E. and Blackburn, M.B. ๒๐๑๐. Distribution of phenotypes among Bacillus thuringiensis strains. Systematic and Applied Microbiology, ๓๓:๒๐๔- ๒๐๘.

Shishir, A., Akter, A., Hassan, Md. H., Kibria, G., Ilias, M., Khan, S. N. and Hoq, M. Md. ๒๐๑๒. Characterization of locally isolated Bacillus thuringiensis for the Development of Eco-friendly Biopesticides in Bangladesh. JBiopest, ๕ (Supplementary) : ๒๑๖-๒๒๒ . (http://www.jbiopest.com/users/LW๘/efiles/Vol_๕_๐_๒๑๖_๒๒๒F.pdf).

Vidyarthi, A. S., Tyagi, R. D., Valero, J. R., Surampalli, R. Y. ๒๐๐๒. Studies on the production of B. thuringiensis based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. Water Research, New York, ๓๖: ๔๘๕๐-๔๘๖๐.

http://www.lib.kps.ku.ac.th/SpecialProject/General_Science/๒๕๕๑/Bs/PongsakornKa/appdx.pdf

๑๓. ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรียที่ใชในการทดลอง

การเตรียมอาหาร Nutrient agar (NA) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

<u>สารเคมี</u>

Beep extract	๓ กรัม
Peptone	๕ กรัม
ผงวุน	๑๕ กรัม
น้ำกลั่น	๑ ลิตร

<u>วิธีการ</u>

๑. beep exact ๓ กรัม peptone ๕ กรัม ผงวุน ๑๕ กรัม และน้ำกลั่น ๑๐๐๐ มิลลิลิตร ผสมใหเขากัน นำไปตมจนผงวุนละลาย
๒. เสร็จแลวตั้งทิ้งไวพออุน บรรจุใสหลอดทดลอง (tube) หรือขวดใสอาหาร (Duran) แลวนำไปนึ่งฆาเชื้อดวยหมอนึ่งความดันไอ ๑๕ ปอนด/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ ๑๒๑ องซาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที
๓. เมื่อนำออกจากหมอนึ่งความดันไอแลวเก็บในที่สะอาด ใชเทใสจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate) โดยหลอมจนอาหารละลายแลวเทใสจานเลี้ยงเชื้อภายในตู laminar flow

การเตรียมอาหาร Nutrient broth (NB) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

<u>สารเคมี</u>

Beep extract	๓ กรัม
Peptone	๕ กรัม
น้ำกลั่น	๑ ลิตร

<u>วิธีการ</u>

๑. beep exact ๓ กรัม peptone ๕ กรัม และน้ำกลั่น ๑๐๐๐ มิลลิลิตร ผสมใหเขากัน นำไปตมจนส่วนผสมละลายเข้ากัน
๒. นำมาบรรจุใสขวดทดลอง (Duran) แลวนำไปนึ่งฆาเชื้อดวยหมอนึ่งความดันไอ ๑๕ ปอนด/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ ๑๒๑ องศาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที

ภาคผนวก ข
ภาพเครื่องมือที่ใชในการทดลอง

<u>ภาพภาคผนวกที่ ข๑</u> เครื่องพีซีอาร์

<u>ภาพภาคผนวกที่ ข๒</u> หม้อนึ่งความดันไอ (autocave)

<u>ภาพภาคผนวกที่ ข๓</u> ตู้บ่มเชื้อ

<u>ภาพภาคผนวกที่ ข๔</u> water barth

<u>ภาพภาคผนวกที่ ข๕</u> เครื่อง spectrophotometer

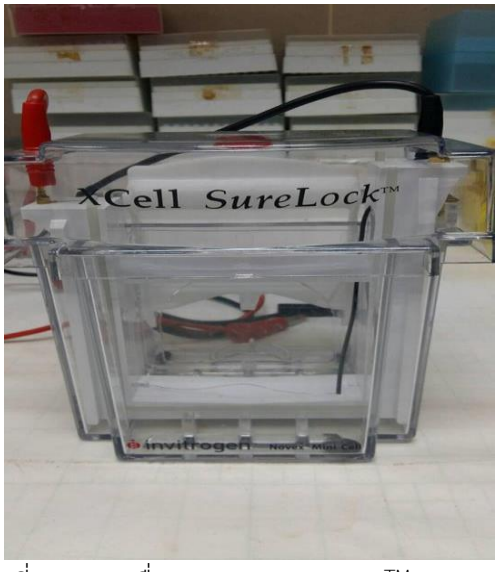
<u>ภาพภาคผนวกที่ ข๖</u> เครื่องชั่งสาร

<u>ภาพภาคผนวกที่ ข๗</u> ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow)

ภาพภาคผนวกที่ ข๘ เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน

ภาพภาคผนวกที่ ข๙ microwave

ภาพภาคผนวกที่ ข๑๐ pipette



<u>ภาพภาคผนวกที่ ข๑๑</u> เครื่อง XCell SureLock™ (NOVEX Mini-Cell)