การเพาะขยายเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยอาหารสูตรต่างๆ

Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for Insect Pests Control on Other Media

นันทนัช พินศรี สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี อิศเรส เทียนทัด ภัทรพร สรรพนุเคราะห์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การเพาะขยายเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช ด้วยอาหารสูตรต่างๆ จากอาหารทั้งหมด 20 ชนิดที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* แล้ว 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจนับโคโลนีและตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น พบว่า มีอาหาร 7 ชนิดที่คาดว่าสามารถเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* ได้ คือ 1.น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม 2.นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้น+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย+เกลือ 3.นมถั่วเหลือง+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย 4.นมถั่วเหลือง+นมจืด+กล้วยหอม+น้ำมะพร้าว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย 5.ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริม 6.ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริม 7. ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริม มี Total cell count เฉลี่ยระหว่าง $3.86x10^{7-}$ $3.89x10^{7}$, $2.5x10^{5}$-$4.63x10^{7}$, $1.15x10^{6}$-$2.12x10^{7}$, $1.4x10^{6}$-$1.68x10^{6}$, $2.11x10^{8}$-$3.15x10^{8}$, $2.00x10^{8}$-$1.22x10^{8}$, $3.01x10^{8}$-$3.61x10^{8}$ cfu/ml ตามลำดับ ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆและขั้นตอนต่อไปนำเชื้อ *B. thuringiensis* ที่ผลิตได้ทั้ง 7 สูตรอาหารมาทำการทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนผีเสื้อวัยที่ 2 ในห้องปฏิบัติการต่อไป

คำหลัก : การเพาะขยาย, เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*, แมลงศัตรูพืช

รหัสการทดลอง 03-05-59-02-01-00-17-60

คำนำ

ในประเทศไทยการวิจัยการใช้เชื้อจุลินทรีย์แมลงเป็นที่ยอมรับเป็นแนวทางหนึ่งในการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพ โดยวิธีการพ่นเหมือนสารฆ่าแมลงในลักษณะสารฆ่าแมลงที่มีชีวิต (living insecticide) อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อจุลินทรีย์แมลงมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้สารฆ่าแมลงในด้านการมีความเฉพาะเจาะจงต่อศัตรูพืชเป้าหมาย ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และโอกาสในการต้านทานและดื้อต่อสารฆ่าแมลงมีน้อยและเชื้อจุลินทรีย์แมลงสามารถกำจัดแมลงที่ทำความเสียหายกับพืช (Dulmage, 1981; อัจฉรา, 2534) มีอัตราการตายสูงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะแมลงศัตรูพืชที่กัดกินใบ สามารถกำจัดได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นการใช้เชื้อจุลินทรีย์แมลงจึงสามารถที่จะควบคุมศัตรูพืชก่อนที่จะถึงระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ (ETL) ซึ่งแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ได้รับการยอมและมีการแนะนำส่งเสริมให้ใช้กำจัดแมลงศัตรูผักอย่างจริงจัง แต่ผลที่ได้ยังไม่เป็นที่พอใจและไม่เป็นที่ยอมรับของเกษตรกรมากนักทั้งนี้ประกอบด้วยเหตุผลหลายประการ เช่น ออกฤทธิ์ช้า เกษตรกรต้องมีความเข้าใจในคุณสมบัติของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* เทคนิคการพ่นสาร และข้อสำคัญคือ ค่าใช้จ่ายของ *Bacillus thuringiensis* ค่อนข้างสูง เมื่อเทียบอัตราการใช้ต่อไร่ระหว่าง *Bacillus thuringiensis* กับสารเคมีฆ่าแมลงสังเคราะห์ จึงเป็นข้อจำกัดที่สำคัญในประเทศที่กำลังพัฒนาบีทีมีการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม ซึ่งในแต่ละประเทศต่างก็มีการพัฒนาและผลิตเชื้อบีทีตามแต่พื้นฐานปัจจัยในประเทศของตน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาการเพาะขยายเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีต่างๆ รวมทั้งชนิดของสารอาหารที่ใช้เพาะขยาย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง มีประสิทธิภาพ ช่วยให้เกษตรกรสามารถนาไปปรับใช้ได้ด้วยตนเอง ซึ่งจะช่วยให้เกษตรกรสามารผลิตแบคทีเรีย บีที โดยวิธีง่ายๆ จากวัสดุอุปกรณ์ที่มีในท้องถิ่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การวิจัยใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เป็นจุลินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืช เริ่มขึ้นในประเทศที่กำลังพัฒนา โดยปัจจัยที่ทำให้การผลิตบีที ในท้องถิ่นมีความเหมาะสมที่จะใช้ควบคุมการทำลายของแมลง คือ ราคาถูกและง่ายในการผลิต ซึ่งในการหาสูตรอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบีทีเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งเพราะบีทีที่เหมาะสมจะสมดุลกับสับสเตรทและสัมพันธ์กับการเจริญ คือ บางสายพันธุ์ของบีทีจะไม่เจริญใน mineral glucose media นอกจากจะเติมกรดอะมิโนบางชนิดซึ่งมาจากแหล่งต่างๆ บางสายพันธุ์การเจริญจะถูกกระตุ้นโดย yeast extract ปริมาณเล็กน้อย ซึ่งในการสร้างสปอร์บีทีจะถูกกระตุ้นโดย inorganic ions ได้แก่ Ca^{2+} และ Mn^{2+} phosphate salts แต่จะเติมในปริมาณมากกว่าที่ต้องการสำหรับการเจริญเติบโตเพราะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ ส่วนการปรับ Mg^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+} และ Zn^{2+} ไอออนจะส่งเสริมการเจริญและการสร้างสปอร์ด้วย (Entwistie และคณะ, 1993) มีงานวิจัยของ Singer and Rogoff (1968) พบว่าบีทีจะเติบโตข้าและสร้างสปอร์น้อยขึ้นอยู่กับธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อถ้ามีน้ำตาลกลูโคสและเกลือมากเกินไป ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการเติมกรดอะมิโนสามารถทำให้เชื้อแบคทีเรียบีทีกลับมาเจริญเติบโตได้

มีการศึกษาโดยใช้อาหารราคาถูก หาง่ายที่มีอยู่ในประเทศไทย เช่น ตับหมูบดผสมร่วมกับกากน้ำตาลกากถั่วเหลืองและ $CaCO_2$ ตับวัวบดผสมร่วมกับกากถั่วเหลือง กากน้ำตาลและ $CaCO_2$ ตับไก่บดผสมร่วมกับกากถั่วเขียว กากน้ำตาลและ $CaCO_2$ สูตรสุดท้ายปลาป่นผสมร่วมกับกากน้ำตาล กากถั่วเหลืองและ $CaCO_2$ เป็นต้น โดยศึกษาและเปรียบเทียบในแต่สูตรอาหาร นำมาใช้เลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* โดยทำการฆ่าเชื้ออาหาร ปรับpH ด้วยในทุกๆสูตร ซึ่ง *B. thuringiensis* มีการเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ในระดับที่ดี (Sothorn, 1975)

อิศเรสและคณะ, 2553 ทำการศึกษาชนิดและปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่หาได้ง่าย โดยใช้นมถั่วเหลืองและนมผงสำเร็จรูปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้วิธีการผลิตแบบมาตรฐาน พบว่ากรรมวิธีนมถั่วเหลืองอัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมถั่วเหลืองอัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมถั่วเหลืองอัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตรนมถั่วเหลืองอัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร และนมผงสำเร็จรูปอัตรา 8 กรัม ได้ปริมาณเฉลี่ยเชื้อ *B. thuringiensis* $4.85x10^8$ cfu/ml, $3.33x10^8$ cfu/ml, $1.29x10^9$ cfu/ml, $4.41x10^8$ cfu/ml, $1.67x10^8$ cfu/ml และ $5.86x10^7$ cfu/ml ตามลำดับ และได้นำเชื้อ *B. thuringiensis* ที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีมาทำการทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอม 56.66, 23.33, 53.33, 23.33, 86.66 และ 53.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากการทดลองผลิตเชื้อ *B. thuringiensis* ด้วยวิธีการพื้นบ้าน โดยใช้นมถั่วเหลืองอัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ1 ลิตรเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการผลิต 4 ครั้ง พบว่าในการผลิตครั้งที่ 1 ไม่สามารถตรวจนับปริมาณเชื้อ *B. thuringiensis* และทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมได้ เนื่องจากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ในการผลิตครั้งที่ 2, 3 และ 4 ได้ปริมาณเชื้อ $7.74x10^4$ cfu/ml, $2.08x10^4$ cfu/ml และ $9.65x10^4$cfu/ml ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตาย 26.66, 40.00 และ 26.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการทดลองผลิตเชื้อ *B. thuringiensis* ด้วยวิธีการพื้นบ้านโดยใช้นมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการผลิต 3 ครั้ง พบว่าในการผลิตครั้งที่ 1, 2 และ 3 ได้ปริมาณเชื้อ Bt ดังนี้ $1.63x10^6$ cfu/ml, $3.86x10^7$ cfu/ml และ $8.91x10^7$cfu/ml ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตาย 6.66, 46.66 และ 70.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยที่ในการผลิตด้วยวิธีการพื้นบ้านทุกครั้งจะมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

สมชัยและคณะ (2555) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตด้วยวิธีต่างๆ โดยทดสอบการเพาะขยายเชื้อแบคทีเรียบีที จากการใช้อาหารเหลว (submerged culture) และอาหารแข็ง (solid state fermentation) ด้วยอาหารชนิดต่างๆ ที่หาได้ทั่วไป ผลการทดลองพบว่า การเพาะขยายเชื้อด้วยอาหารแข็ง ได้แก่ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์, ข้าวฟ่าง, ชานอ้อยผสมรา และข้าวสุกมี Total cell count และ Spore count สูงกว่าการใช้อาหารเหลว โดยการเพาะขยายเชื้อด้วยอาหารแข็งมี Total cell count และ Spore count เฉลี่ยระหว่าง $8.8x10^7$-$2.9x10^8$ และ $2.4x10^7$-$8.4x10^7$ CFU/ml ตามลำดับ ส่วนการใช้อาหารเหลว ได้แก่ น้ำมะพร้าวผสมไข่ไก่, น้ำมะพร้าว, นมข้นหวาน และหางนม มี Total cell count และ Spore count เฉลี่ยระหว่าง $4.5x10^6$-$3.2x10^7$ และ $3.3x10^5$-$1.2x10^7$ CFU/ml

ตามลำดับ โดยเชื้อแบคทีเรียบีทีมาตรฐาน มี Total cell count และ Spore count เฉลี่ย $1.8x10^{10}$ และ $5.1x10^{9}$ CFU/ml เมื่อนำผลผลิตที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผัก วัย 2 ด้วย Feeding method บนอาหารเทียม พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะขยายมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานอย่างชัดเจน มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ยระหว่าง 2.0-36.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแบคทีเรียบีทีมาตรฐานมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์

ซึ่งจากการทดลองดังกล่าวทางคณะวิจัยเห็นว่าถ้ามีการทดลองการวิเคราะห์ธาตุอาหารก่อนการทดลองแล้วทำการปรับปรุงสูตรเพื่อเหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบีทีน่าจะให้หาสูตรอาหารที่ง่ายต่อการผลิตบีทีแล้วนำไปถ่ายทอดให้เกษตรกรทำได้อย่างสะดวกและง่ายต่อการใช้ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* สายพันธุ์กรมวิชาการเกษตร
2. หนอนกระทู้หอม หนอกระทู้ผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย
3. อาหารเทียมเลี้ยงแมลง
4. อาหารเหลว Nutrient Broth
5. เครื่องเขย่า (Shaker)
6. ตู้เขี่ยเชื้อ
7. Micropipette, eppendorp tube
8. ถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1. การศึกษาคุณสมบัติอาหารเพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus thuringiensis* (2560)

นำวัตถุดิบที่มีรายงานการใช้ประโยชน์และมีองค์ประกอบที่คาดว่าสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการเพาะขยายเชื้อแบคทีเรียมาวิเคราะห์หาธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แร่ธาตุเหล่านี้ได้แก่ organic carbon, N, P, K, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+} และ Zn^{2+} เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคัดเลือกอาหารสำหรับนำไปเพาะขยายเชื้อบีทีต่อไป โดยเปรียบเทียบกับอาหารเหลวมาตรฐานที่ใช้ในการเพาะขยายเชื้ออยู่เดิม คือ Nutrient Broth โดยจะเน้นการใช้วัตถุดิบจากแหล่งต่างๆ ที่เกษตรกรสามารถหาซื้อได้ง่าย หรือนำของเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมทางการเกษตรชนิดต่างๆ ที่คาดว่าจะมีธาตุอาหารที่เหมาะสมในการเพาะขยายเชื้อแบคทีเรียกลับมาใช้ใหม่ให้เกิดประโยชน์ นอกจากจะช่วยลดมลภาวะที่เกิดจากของเสียแล้วยังเป็นการประหยัดต้นทุนในการผลิตได้เป็นอย่างดี

อาหารสูตรที่ 1 ตับไก่+ไวตามิลค์+กากน้ำตาล 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 2 นมผง+อาหารแมว 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 3 น้ำนมถั่วเหลือง+อาหารแมว 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 4 น้ำนมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 5 นมข้นหวาน+อาหารแมว 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 6 น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 7 น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง 200 มิลลิลิตร

เมื่อได้ผลวิเคราะห์องค์ประกอบและแร่ธาตุอาหารจากวัตถุดิบดังกล่าวข้างต้น จึงนำไปศึกษาการผลิตขยายเชื้อบีทีและตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ เพื่อหาวัตถุดิบชนิดใดมีความเหมาะสมในการเพาะขยายเชื้อ *B. thuringiensis*

บันทึกข้อมูล

-ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบและธาตุอาหารในวัตถุดิบชนิดต่างๆ

-ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในแต่ละวัตถุดิบที่นำมาเพาะขยายเชื้อแบคทีเรียบีที

ขั้นตอนที่ 2. วิธีเพาะขยายแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* จากสูตรอาหารชนิดต่างๆ (2560-2561)

2.1 นำเชื้อ *B. thuringiensis* มาเพาะกล้าเชื้อ แล้วนำไปปลูกเชื้อลงในวัตถุดิบชนิดต่างๆ ในข้อที่ 1 ด้วยการใช้เครื่องเขย่า (Shaker) เพื่อให้เกิดการหมุนเวียนของอาหารและได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ โดยใช้กล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัตถุดิบ ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 ml ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่อัตรา 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.2 ศึกษาการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์โดยตรวจวัดการเจริญเติบโตของ *B. thuringiensis* และปริมาณของ crystal toxin ที่เชื้อ *B. thuringiensis* ผลิตขึ้นมาจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อในข้อ 1 โดยเก็บตัวอย่างที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตัวอย่างที่เก็บในแต่ละครั้งให้นำเชื้อที่ได้ไปตรวจนับจำนวนเซลล์ (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 ตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเข้ามาในระหว่างขบวนการผลิต

บันทึกข้อมูล

- บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อ *B. thuringiensis* ในแต่ละวิธีการผลิต
- ตรวจสอบและนับปริมาณของ crystal toxin ที่เชื้อ *B. thuringiensis* สร้างขึ้น
- บันทึกปริมาณและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในระหว่างขบวนการผลิต
- ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ใช้เพาะขยายเชื้อในแต่ละสูตรก่อนและหลังการเพาะเลี้ยง

ขั้นตอนที่ 3. ศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* ที่เจริญในสูตรอาหารต่างๆ

3.1 ศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* ที่เจริญในสูตรอาหารต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ (2561)

นำ *B. thuringiensis* ที่เจริญในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อนำมาทดสอบในห้องปฏิบัติการโดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีอัตราความเข้มข้น 5 ระดับ ดังนี้ $1x10^5$, $1x10^6$, $1x10^7$, $1x10^8$ และ $1x10^9$ cfu/ml จากนั้นนำหนอนผีเสื้อศัตรูพืชที่สำคัญคือ หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผักและหนอนเจาะสมอฝ้ายที่เก็บจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเทียมจนได้หนอนรุ่นที่ 1 หรือ 2 นำมาทดสอบหาค่าความเป็นพิษของเชื้อ *B. thuringiensis* ที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารอย่างง่ายตามอัตราความเข้มข้นต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1. เชื้อ *B. thuringiensis* ความเข้มข้น $1x10^5$ cfu/ml
กรรมวิธีที่ 2. เชื้อ *B. thuringiensis* ความเข้มข้น $1x10^6$ cfu/ml
กรรมวิธีที่ 3. เชื้อ *B. thuringiensis* ความเข้มข้น $1x10^7$ cfu/ml
กรรมวิธีที่ 4. เชื้อ *B. thuringiensis* ความเข้มข้น $1x10^8$ cfu/ml
กรรมวิธีที่ 5. เชื้อ *B. thuringiensis* ความเข้มข้น $1x10^9$ cfu/ml
กรรมวิธีที่ 6. Control

ทดสอบความเป็นพิษของเชื้อ *B. thuringiensis* โดยวิธี surfaced layer method บนอาหารเทียมเลี้ยงแมลงโดยหยดเชื้อ *B. thuringiensis* ในอัตราความเข้มข้นต่างๆ ดังกล่าวลงบนอาหารเทียมที่เตรียมไว้ในถ้วยพลาสติกสำหรับทดสอบ เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารจากนั้นปล่อยหนอนลงไปถ้วยละ 1 ตัว ใช้หนอนทดลองซ้ำละ 10 ตัว

<u>บันทึกข้อมูล</u>

- ตรวจนับจำนวนหนอนที่ตายในแต่ละกรรมวิธีทุก 24 ชั่วโมงหลังการทดลองจนครบ 7 วัน
- ปรับค่าเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott's formula ถ้าพบหนอนตายใน control จากนั้นนำจำนวนหนอนตายมาหาค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้หนอนตาย 50 % ด้วยโปรแกรม Probit analysis

3.2 ศึกษาประสิทธิภาพของ*Bacillus thuringiensis* ที่เจริญในสูตรอาหารต่างๆ ในแปลงปลูกเกษตรกร (2562)

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. thuringiensis* ที่ผลิตได้กับหนอนผีเสื้อศัตรูพืชที่สำคัญ 2 ชนิด คือ หนอนกระทู้ผักและหนอนใยผักในแปลงปลูกเกษตรกร ทำการวางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 5 ซ้ำ 7 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วยสารละลาย *B. thuringiensis* ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 อัตรา 100 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วยสารละลาย *B. thuringiensis* ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 อัตรา 100 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยสารละลาย *B. thuringiensis* ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 อัตรา 100 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยสารละลาย *B. thuringiensis* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว Nutrient Broth อัตรา 100 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยบีทีสายพันธุ์การค้า อัตราตามฉลากแนะนำ

กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วยสาร chlorfenapyr 10% sc อัตรา 40 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 ไม่ควบคุมศัตรูพืช (control)

เตรียมแปลงปลูกคะน้าขนาด 2x5 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลงประมาณ 80 เซนติเมตร หว่านเมล็ดคะน้า 2 กิโลกรัมต่อไร่ ถอนแยกเมื่อคะน้าอายุ 15-20 วัน หลังหว่านเมล็ด ให้มีระยะระหว่างต้น 10-15 เซนติเมตร พ่น *B. thuringiensis* และสารเคมีตามกรรมวิธี เมื่อพบหนอนระบาด 1 ตัวต่อต้น ในช่วงเย็นหลังเวลา 16.00 น. ด้วยเครื่องพ่นสะพายหลังชนิดแรงดันน้ำสูง ไร่ พ่นทุก 7 วัน โดยพ่นไม่น้อยกว่า 4 ครั้ง

บันทึกข้อมูล

- ตรวจนับจำนวนหนอนหนอนกระทู้ผักและหนอนใยผัก จำนวน 20 ต้น ต่อแปลงย่อย ก่อนพ่น *B. thuringiensis* และสารเคมีตามกรรมวิธีทุกครั้ง และหลังพ่น *B. thuringiensis* และสารเคมีตามกรรมวิธีครั้งสุดท้าย บันทึกข้อมูล
- บันทึกข้อมูลน้ำหนักผลผลิตที่ได้
- นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ

สถานที่ทำการทดลองเก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรและแปลงเกษตรกรในพื้นที่ปลูกผักภาคตะวันตก

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ดินและน้ำก่อนการทดลอง

สำรวจหาซื้อนมผงเด็ก น้ำตาล น้ำนมถั่วเหลือง ปลาป่น กากน้ำตาล ตับวัวหมูบด ตับไก่บด น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตมันสำปะหลัง เนื่องจากได้ทดลองใช้น้ำทิ้งจากมันสำปะหลังแล้วพบว่าการหาซื้อหรือผลผลิตที่ได้ในแต่ละครั้งมีธาตุอาหารต่างกันจึงคิดใช้อาหารอื่นขึ้นมาแทน คือ นมข้นหวาน อาหารสุนัข อาหารแมว น้ำผึ้ง ครีมเทียม น้ำโพดเข้มข้น เกลือ น้ำตาล นมถั่วเหลือง กล้วยหอม น้ำมะพร้าว แป้งมัน ผงฟูและปุ๋ย นำวัตถุดิบที่จัดหามาได้มาผสมกันเป็นสูตรอาหารต่างๆ แล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อโรค (autoclave) หลังจากนั้นนำส่วนหนึ่งไปส่งวิเคราะห์ธาตุอาหารและอีกส่วนนำลงกล้าเชื้อบีทีที่ความเข้มข้น 10^9 ปริมาณ 5% ของปริมาณอาหาร เขย่าเป็นเวลา 3 วัน

สูตรอาหารที่เตรียมเพื่อเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis*

อาหารสูตรที่ 1 ตับไก่+ไวตามิลค์+กากน้ำตาล 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 2 นมผง+อาหารแมว 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 3 น้ำนมถั่วเหลือง+อาหารแมว 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 4 น้ำนมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 5 นมขันหวาน+อาหารแมว 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 6 น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 7 น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 8 นมถั่วเหลือง+นมข้น+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18) 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 9 นมถั่วเหลือง+นมข้น+อาหารหมา+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18) 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 10 น้ำนมวัว+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18) 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 11 น้ำนมวัว+นมข้น+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18) 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 12 นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้น+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18) 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 13 นมถั่วเหลือง+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18) 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 14 นมถั่วเหลือง+นมผง+นมข้น+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18) 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 15 นมถั่วเหลือง+นมจืด+กล้วยหอม+น้ำมะพร้าว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18) 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 16 นมถั่วเหลือง+นมผง+นมข้น+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18) 200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 17 ซุปไก่สกัดเข้มข้น+200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 18 ซุปหมูสกัดเข้มข้น+200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 19 ซุปเนื้อสกัดเข้มข้น+200 มิลลิลิตร

อาหารสูตรที่ 20 อาหารเหลว Nutrient Broth 200 มิลลิลิตร

หลังจากเขย่าเชื้อในสูตรอาหารแล้ว หลังจากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนีของ *B. thuringiensis* โดยใช้วิธี tenfold dilution บ่มเป็นเวลา 1 วัน

แต่เนื่องจากสูตรอาหารที่คิดไว้ ผลยังไม่เป็นตามที่คาดการณ์ไว้ *B. thuringiensis* ยังผลิตทั้งสปอร์และผลึกโปรตีนไม่มากพอ คณะผู้วิจัยเลยพยายามคิดค้นและทดลองสูตรอาหารอื่นๆเพิ่มเติม แต่ไม่ได้ส่งวิเคราะห์เนื่องมาจากไม่มีงบประมาณเพียงพอจึงวิเคราะห์ได้ 13 สูตร (ตารางที่ 1)

ผลการวิเคราะห์ธาตุ N P K และ pH จากห้องปฏิบัติการเคมีและสิ่งแวดล้อม ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิเคราะห์และวิธีตรวจสอบ N: วัดปริมาณไนโตรเจน โดย Kjeldahl method

P: วัดปริมาณด้วย Colorimetric method

K: วัดปริมาณด้วย Atom Emission Spectrophotometer

หลังจากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับสูตรอาหารของ Fernando Hercos Valicente *et al.* (2010) ได้เพาะเลี้ยงบีทีในอาหาร 3 ชนิด แล้วมาวิเคราะห์ธาตุอาหารที่ *B. thuringiensis* ต้องการ คือ

1. Luria Bertani+เกลือ
2. กลูโคส1.5%+แป้งถั่วเหลือง 0.5%+เกลือ
3. ปุ๋ยมูลหมูเหลว (4%)

ผลที่ได้คือ สูตรที่ 1 Luria Bertani+เกลือ สามารถเพาะเลี้ยงได้ $2.0x10^{8}$ cfu/ml สูตรที่ 2 กลูโคส 1.5%+แป้งถั่วเหลือง 0.5%+เกลือ สามารถเพาะเลี้ยงได้ $2.0x10^{8}$ cfu/ml สูตรที่ 3 ปุ๋ยมูลหมูเหลว (4%) สามารถเพาะเลี้ยงได้ $1.5x10^{8}$cfu/ml แต่เป็นสูตรที่ 2 เป็นสูตรที่ใกล้เคียงกับอาหารอย่างง่ายจึงนำมาเป็นตัวเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ธาตุ N P K และ pH จากห้องปฏิบัติการเคมีและสิ่งแวดล้อม ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คือ สูตรที่ใช้น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม มีค่า N 2,580 Mg/L ค่า P 503 Mg/L ค่า K 1,086 Mg/L และค่า pH 5.42 สูตรที่ใช้น้ำนมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้น+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย (18-18-18) ค่า N 5,093 Mg/L ค่า P 10.87 Mg/L ค่า K 2,111 Mg/L และค่า pH 6.27 และสูตรที่ใช้นมถั่วเหลือง+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย (18-18-18) ค่า N 3,484 Mg/L ค่า P 18.17 Mg/L ค่า K 2,200 Mg/L และค่า pH 6.37 ประกอบกับ 3 สูตรดังกล่าวเมื่อนำเอาอาหารไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า มีทั้งเซลล์สปอร์และผลึกโปรตีนของบีทีอยู่ด้วย (ตารางที่ 3) และสูตรอาหารที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์แต่ทดลองเลี้ยงแล้วพบว่ามีทั้งเซลล์สปอร์และผลึกโปรตีนของบีที คือ สูตรที่ใช้นมถั่วเหลือง+นมจืด+กล้วยหอม+น้ำมะพร้าว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย สูตรที่ใช้ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริม สูตรที่ใช้ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริม สูตรที่ใช้ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริม สูตรอาหารทั้ง 7 ชนิดมี Total cell count เฉลี่ยระหว่าง $3.86x10^{7}$- $3.89x10^{7}$, $2.5x10^{5}$-$4.63x10^{7}$, $1.15x10^{6}$-$2.12x10^{7}$, $1.4x10^{6}$-$1.68x10^{6}$, $2.11x10^{8}$-$3.15x10^{8}$, $2.00x10^{8}$-$1.22x10^{8}$, $3.01x10^{8}$-$3.61x10^{8}$ cfu/ml ตามลำดับ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การเพาะขยายเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช ด้วยอาหารสูตรต่างๆ จำนวน 20 ชนิด พบว่า สูตรอาหารที่เลี้ยงด้วย 1.น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม 2.นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้น+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย+เกลือ 3.นมถั่วเหลือง+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย 4.นมถั่วเหลือง+นมจืด+กล้วยหอม+น้ำมะพร้าว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย 5.ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริม 6.ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริม 7. ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริม สามารถพัฒนาต่อได้ เพราะจากการวิเคราะห์ธาตุอาหาร N C K และ pH มีธาตุอาหารสูงใกล้เคียงกับสูตรอาหารที่เหมาะสม อีกทั้งยังเมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ามีสปอร์และผลึกโปรตีนจำนวนมาก

คำขอบคุณ

ทีมงานที่กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชที่ให้ความร่วมมือและช่วยปฏิบัติงานทดลองครั้งนี้เป็นอย่างยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี อิศเรสเทียนทัด และภัทรพร สรรพนุเคราะห์. 2555. ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตด้วยวิธีต่างๆ. หน้า 765-771 *ใน*: *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.* กรมวิชาการเกษตร.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2534. แบคทีเรียควบคุมแมลงศัตรูพืช. หน้า 148-166. *ใน*: *เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี.* กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

อิศเรส เทียนทัด อัจฉรา ตันติโชดก และสมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี. 2553. การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตด้วยวิธีการมาตรฐาน และวิธีการผลิตแบบพื้นบ้าน. หน้า 801-809 *ใน*: *รายงานประจำปี 2553 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.* กรมวิชาการเกษตร.

De Barjac, H., and E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga* 35:233-240.

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.

Entwistle, P.F., J.S. Cony, M. J. Bailey and S. Higgs. 1993. *Bacillus thuringiensis, and Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. 267 p.

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.*

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ธาตุ N P และ K จากห้องปฏิบัติการเคมีและสิ่งแวดล้อม ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สูตรอาหาร	N (Mg/L)	P (Mg/L)	K (Mg/L)	pH
1. ตับไก่+ไวตามิลล์+กากน้ำตาล	2,570	272	5,720	4.94
2.นมผง+อาหารแมว	3,265	582	1,347	6.28
3.น้ำนมถั่วเหลือง+อาหารแมว	1,695	293	742	6.86
4น้ำนมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข	1,761	333	704	6.67
5.นมข้นหวาน+อาหารแมว	1,295	391	1,120	6.05
6.น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม	2,580	503	1,086	5.42
7.น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง	1110.6	ND	7,814	6.04
8.นมถั่วเหลือง+นมข้น+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18)	4,493	9.62	1,998	6.52
9.นมถั่วเหลือง+นมข้น+อาหารหมา+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18)	3,408	10.51	1,668	6.66
10.นมวัว+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18)	2,589	9.98	1,950	6.46
11.นมวัว+นมข้น+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18)	5,236	9.26	2,503	6.46
12.นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้น+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18)	5,093	10.87	2,111	6.27
13.นมถั่วเหลือง+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย(18-18-18)	3,484	18.17	2,200	6.37

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ธาตุอาหารที่บีทีต้องการของ Fernando Hercos Valicente *et al.*

Media	N	C	K	Ca	Mg	S	Zn	Fe	Cu	Mn	Na
1. LB+salts	18.883	23.803	770.0	2.92	32.08	99.18	7.23	6.30	0.23	9.33	163.3
2. กลูโคส1.5%, แป้งถั่วเหลือง0.5% + เกลือ	544.71	12.971	77.33	7.29	30.62	63.17	5.83	4.90	0.23	7.47	25.7
3. ปุ๋ยมูลหมูเหลว (4%)	5426.9	4170.69	46.67	10.21	2.92	0.0	1.17	3.03	0.47	0.70	16.4

ตารางที่ 3 จำนวนโคโลนีสปอร์และผลึกโปรตีนของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่างๆ

สูตรอาหาร (200 มิลลิลิตร)	จำนวนเซลล์ (cfu/ml)		จำนวนสปอร์	จำนวนผลึกโปรตีน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		
1. ตับไก่+ไวตามิลล์+กากน้ำตาล	$1.27x10^{7}$	$1.13x10^{7}$	-	-
2. นมผง+อาหารแมว ไม่พบผลึกโปรตีน	$9.98x10^{6}$	$1.48x10^{7}$	-	-
3. น้ำนมถั่วเหลือง+อาหารแมว	$1.94x10^{7}$	$1.83x10^{7}$	-	1
4. น้ำนมถั่วเหลือง+อาหารสุนัข	$2.53x10^{6}$	$3.02x10^{6}$	-	-
5. นมขันหวาน+อาหารแมว	$1.16x10^{7}$	$3.48x10^{7}$	-	1
6. น้ำเต้าหู้+น้ำผึ้ง+เกลือ+ครีมเทียม	$3.89x10^{7}$	$3.86x10^{7}$	-	2
7. น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง	$3.24x10^{7}$	$1.68x10^{7}$	-	-
8. นมถั่วเหลือง+นมข้น+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	$3.3x10^{6}$	$1.27x10^{5}$	-	-
9. นมถั่วเหลือง+นมข้น+อาหารหมา+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	$3.3x10^{6}$	$8.83x10^{5}$	-	-
10. น้ำนมวัว+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	$1.6x10^{5}$	$1.63x10^{5}$	-	-
11. นมวัว+นมข้น+อาหารแมว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	$1.01x10^{6}$	$2.5x10^{5}$	-	1
12. นมถั่วเหลือง+นมวัว+นมข้น+อาหารแมว+ผงฟู+ปุ๋ย+เกลือ	$2.5x10^{5}$	$4.63x10^{7}$	-	1
13. นมถั่วเหลือง+นมผง+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	$1.15x10^{6}$	$2.12x10^{7}$	1	2
14. นมถั่วเหลือง+นมผง+นมข้น+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	$9.62x10^{5}$	$6.73x10^{6}$	1	1
15. นมถั่วเหลือง+นมจืด+กล้วยหอม+น้ำมะพร้าว+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	$1.4x10^{6}$	$1.68x10^{6}$	-	1
16. นมถั่วเหลือง+นมผง+นมข้น+แป้งมัน+เกลือ+ผงฟู+ปุ๋ย	$4.5x10^{5}$	$5.18x10^{5}$	-	-
17. ซุปก้อนสูตรไก่+ธาตุอาหารเสริม	$2.11x10^{8}$	$3.15x10^{8}$	61	23
18. ซุปก้อนสูตรหมู+ธาตุอาหารเสริม	$2.00x10^{8}$	$1.22x10^{8}$	48	15
19. ซุปก้อนสูตรเนื้อ+ธาตุอาหารเสริม	$3.01x10^{8}$	$3.61x10^{8}$	45	18
20. Nutrient broth	$2.6x10^{8}$	$3.19x10^{9}$	434	679