การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตด้วยวิธีการมาตรฐาน และวิธีการผลิตแบบพื้นบ้าน

Comparative Study on the Efficacy of Standard Bt Production and Local Bt Production

อิศเรส เทียนทัด อัจฉรา ตันติโชดก สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาชนิดและปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่หาได้ง่าย โดยใช้นมถั่วเหลืองและนมผงสำเร็จรูปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้วิธีการผลิตแบบมาตรฐาน พบว่ากรรมวิธีนมถั่วเหลืองอัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมถั่วเหลืองอัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมถั่วเหลืองอัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมถั่วเหลืองอัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร และนมผงสำเร็จรูปอัตรา 8 กรัม ได้ปริมาณเฉลี่ยเชื้อ Bt 4.85 x x 10^8 cfu/ml , 3.33 x x 10^8 cfu/ml , 1.29 x x 10^9 cfu/ml, 4.41 x x 10^8 cfu/ml, 1.67 x x 10^8 cfu/ml และ 5.86 x x 10^7 cfu/ml ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อ Bt ที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีมาทำการทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอม 56.66, 23.33, 53.33, 23.33, 86.66และ 53.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากการทดลองผลิตเชื้อ Bt ด้วยวิธีการพื้นบ้าน โดยใช้นมถั่วเหลืองอัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตรเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการผลิต 4 ครั้ง พบว่าในการผลิตครั้งที่ 1 ไม่สามารถตรวจนับปริมาณเชื้อ Bt และทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมได้ เนื่องจากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ในการผลิตครั้งที่ 2, 3 และ 4 ได้ปริมาณเชื้อ 7.74 x 10^4 cfu/ml, 2.08 x 10^4 cfu/ml และ 9.65 x 10^4 cfu/ml ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตาย 26.66, 40.00 และ 26.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการทดลองผลิตเชื้อ Bt ด้วยวิธีการพื้นบ้าน โดยใช้นมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตรเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการผลิต 3 ครั้ง พบว่าในการผลิตครั้งที่ 1, 2 และ 3 ได้ปริมาณเชื้อ Bt ดังนี้ 1.63 x 10^6 cfu/ml, 3.86 x 10^7 cfu/ml และ 8.91 x 10^7 cfu/ml ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตาย 6.66, 46.66 และ 70.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยที่ในการผลิตด้วยวิธีการพื้นบ้านทุกครั้งจะมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

รหัสการทดลอง 07-01-49-05-04-01-04-52

คำนำ

การผลิตขยายเชื้อ Bt เหมือนกับการผลิตเชื้อแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่ต้องการปัจจัยในการเจริญเติบโตที่สำคัญต่างๆ ในขบวนการผลิตในถังหมักเชื้อ ซึ่งปัจจุบันเทคโนโลยีการหมักมีความเจริญก้าวหน้าเป็นอย่างยิ่ง เชื้อแบคทีเรีย Bt สามารถเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณให้ได้มากๆ ซึ่งในเชื้อแบคทีเรีย Bt บางสายพันธุ์สามารถใช้ขบวนการหมักโดยใช้อาหารแข็ง (solid state fermentation) ในการเลี้ยงขยายได้ (Suyanandana *et al.,* 1996) แต่โดยส่วนใหญ่แล้วการผลิตเชื้อ Bt ในปริมาณมากๆ จะใช้ถังหมักขนาดใหญ่ ซึ่งใช้อาหารเหลว (submerged culture) ที่มีส่วนประกอบของ carbon source และ nitrogen source ในอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการผลิตผลึกสารพิษ นอกจากนี้ยังต้องมีวิตามินและแร่ธาตุต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารและการถ่ายเทอากาศภายในถังหมักเชื้อ (Singer and Rogoff, 1968) เหล่านี้เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งที่ช่วยในการผลิตให้ได้เชื้อ Bt ในปริมาณมาก แต่สิ่งที่สำคัญที่สุดอีกประการหนึ่งในการผลิตเชื้อ Bt คือการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นเข้ามาในระหว่างขบวนการผลิต เนื่องจากเชื้อ Bt มีความสามารถต่ำในการเจริญเติบโตแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ถ้าเกิดการปนเปื้อนเข้ามาในการผลิตครั้งนั้นๆ จะไม่ได้เชื้อ Bt เลย เพราะของเสียที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจะทำให้เชื้อ Bt ตาย ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านขบวนการฆ่าเชื้อแล้วก่อนที่นำมาใช้ในการผลิต

ปัจจุบันได้มีการส่งเสริมกันอย่างแพร่หลายให้เกษตรกรได้ผลิตเชื้อ Bt ไว้ใช้เอง เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตในด้านการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งในการผลิตเชื้อวิธีนี้ จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นนั้นๆ ไม่ว่าจะเป็นน้ำมะพร้าว กากน้ำตาล หรือใช้ไข่ไก่ ทำการหมักทิ้งไว้ค้างคืนหรือทิ้งไว้ประมาณ 2 วัน แล้วจึงนำมาผสมน้ำฉีดพ่นลงบนพืชตามปกติ แต่การผลิตเชื้อวิธีนี้ยังไม่มีงานวิจัยรับรองเป็นหลักฐาน หรือเป็นข้อเท็จจริงแน่นอนว่า เชื้อ Bt ที่ผลิตได้จะสามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชได้จริง และเชื้อที่ได้นั้นเป็นเชื้อ Bt จริงหรือไม่ นอกจากนี้แล้วการผลิตเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ผ่านขบวนการฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้ จะมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นปนเปื้อนอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งผู้ใช้หรือเกษตรกรจะไม่มีทางทราบได้เลยว่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนนั้นๆ เป็นชนิดใดและก่อให้เกิดโทษแก่มนุษย์และสัตว์เลี้ยงอย่างไรบ้าง ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเปรียบเทียบถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยของวิธีการผลิตดังกล่าว เพื่อเผยแพร่ให้เกษตรกรได้รับรู้เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจในการจะใช้เชื้อ Bt ที่ผลิตขึ้นมาเอง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

๑. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

2. นมถั่วเหลืองพร้อมดื่ม

3. นมผงสำเร็จรูป

๔. Nutrient broth

5. ตู้เขี่ยเชื้อ

6. ถังน้ำดื่มพลาสติกขนาด 5 ลิตร

๗. เครื่องปั๊มลมขนาดเล็ก

วิธีการ

<u>การทดลองที่ 1</u> ศึกษาชนิดและปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่หาได้ง่าย เพื่อที่จะนำมาใช้ในการผลิตด้วยวิธีการพื้นบ้าน โดยทำการคัดเลือกใช้นมถั่วเหลืองพร้อมดื่มและนมผงสำเร็จรูปซึ่งหาได้ง่ายและมีอัตราส่วนธาตุอาหารที่คงที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลองใช้ในอัตราต่างๆ ดังนี้

1. นมถั่วเหลือง 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร

2. นมถั่วเหลือง 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร

3. นมถั่วเหลือง 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร

4. นมถั่วเหลือง 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร

5. นมผงสำเร็จรูป 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร

6. นมผงสำเร็จรูป 8 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร

นำอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ที่ผสมน้ำแล้วจำนวน 100 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ขนาด 200 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเริ่มทำการผลิตขยายเชื้อโดยใช้วิธีแบบมาตรฐาน คือทำการฆ่าเชื้อที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี sterilization และทำการเขี่ยเชื้อ Bt ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 1 มิลลิลิตร แล้วนำเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ Bt ในแต่ละสูตรอาหารที่ได้มาทำการตรวจนับปริมาณเชื้อ และตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าหนอน

<u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ Bt ที่ผลิตด้วยวิธีการแบบพื้นบ้าน

ทำการคัดเลือกอัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ในการทดลองที่ 1 ที่ดีที่สุดมาทำการผลิตขยายเชื้อด้วยวิธีการแบบพื้นบ้าน ซึ่งมีวิธีการผลิตดังนี้

1. นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาผสมน้ำตามอัตราส่วนแล้วเทลงในถังพลาสติกจำนวน 4 ลิตร โดยไม่มีการฆ่าเชื้อในอาหารก่อนทำการเลี้ยงเชื้อ

2. ใส่เชื้อ Bt ที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นจำนวน 100 มิลลิลิตรลงในถัง

3. ทำการให้อากาศกับเชื้อโดยใช้สายยางต่อเข้ากับเครื่องปั๊มลมแล้วใส่ลงไปในถัง

ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ Bt ที่ได้มาทำการตรวจนับปริมาณเชื้อ ตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น และตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าหนอน

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2551 – กันยายน 2553

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1

จากการศึกษาถึงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและอัตราส่วนที่เหมาะสม ซึ่งได้เลือกใช้นมถั่วเหลืองพร้อมดื่มและนมผงสำเร็จรูปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากหาได้ง่ายและมีอัตราส่วนธาตุอาหารที่คงที่ ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้เครื่องเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ Bt ได้มาทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ตรวจนับปริมาณเชื้อ และตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าหนอน ในทุกกรรมวิธีการผลิตดำเนินการทดลอง 2 ครั้ง พบว่าในทุกกรรมวิธีการผลิตไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น และได้ปริมาณเชื้อ Bt ในแต่ละกรรมวิธีดังนี้ ในการผลิตครั้งที่ 1กรรมวิธีนมถั่วเหลืองอัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้เชื้อ Bt 2.68×10^8 cfu/ml นมถั่วเหลืองอัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้เชื้อ Bt 3.81×10^8 cfu/ml นมถั่วเหลืองอัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้เชื้อ Bt 2.04×10^9 cfu/ml นมถั่วเหลืองอัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้เชื้อ Bt 3.3×10^8 cfu/ml นมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ได้เชื้อ Bt 1.41×10^8 cfu/ml และนมผงสำเร็จรูปอัตรา 8 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ได้เชื้อ Bt 1.5×10^7 cfu/ml ในการผลิตครั้งที่ 2 กรรมวิธีนมถั่วเหลืองอัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้เชื้อ Bt 7.03×10^8 cfu/ml นมถั่วเหลืองอัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้เชื้อ Bt 2.85×10^8 cfu/ml นมถั่วเหลืองอัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้เชื้อ Bt 5.86×10^8 cfu/ml นมถั่วเหลืองอัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้เชื้อ Bt 2.23×10^8 cfu/ml นมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ได้เชื้อ Bt 1.93×10^8 cfu/ml และนมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ได้เชื้อ Bt 1.23×10^6 cfu/ml และได้ปริมาณเฉลี่ยเชื้อ Bt จากกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้ กรรมวิธีนมถั่วเหลืองอัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมถั่วเหลืองอัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมถั่วเหลืองอัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมถั่วเหลืองอัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร และนมผงสำเร็จรูปอัตรา 8 กรัม ได้ปริมาณเฉลี่ยเชื้อ Bt $4.85 \times \times 10^8$ cfu/ml , $3.33 \times \times 10^8$ cfu/ml , $1.29 \times \times 10^9$ cfu/ml, $4.41 \times \times 10^8$ cfu/ml, $1.67 \times \times 10^8$ cfu/ml และ $5.86 \times \times 10^7$ cfu/ml ตามลำดับ (ตาราง 1) จากการทดลองใช้นมผงสำเร็จรูปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าที่กรรมวิธีนมผงสำเร็จรูปอัตรา 8 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร จะให้ปริมาณเชื้อ Bt ต่ำกว่ากรรมวิธีนมผง 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เนื่องจากขณะที่เชื้อ Bt อยู่ในช่วงการแบ่งเซลล์ ขบวนการ metabolism ของ Bt ในสภาวะที่มีปริมาณของ nitrogen source มากเกินไปจะปลดปล่อยของเสียออกมามาก ทำให้ค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นลดต่ำลง ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อหยุดชะงัก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของอัจฉรา (2533) และอัจฉรา (2544)

เมื่อนำเชื้อ Bt ที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีมาทำการทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 พบว่าในกรรมวิธีนมถั่วเหลืองอัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมถั่วเหลืองอัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมถั่วเหลืองอัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมถั่วเหลืองอัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร นมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร และนมผงสำเร็จรูปอัตรา 8 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร มีเปอร์เซ็นต์

การตายของหนอนกระทู้หอม 56.66, 23.33, 53.33, 23.33, 86.66และ 53.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนในการผลิตครั้งที่ 2 ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพเฉพาะกรรมวิธีนมผงสำเร็จรูป เนื่องจากในกรรมวิธีการใช้นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อได้มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นเกิดขึ้นในระหว่างขบวนการเก็บรักษา จึงไม่สามารถนำมาทดสอบประสิทธิภาพได้ โดยที่กรรมวิธีนมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร และนมผงสำเร็จรูปอัตรา 8 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอม 80.00 และ 60.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตาราง 2)

จากผลการทดลองที่ได้ จึงได้คัดเลือกกรรมวิธีนมถั่วเหลืองอัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร และนมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองการผลิตเชื้อ Bt ด้วยวิธีการพื้นบ้านต่อไป เนื่องจากเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณเชื้อ Bt ที่ดีที่สุดและมีประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนกระทู้หอมที่ดี

การทดลองที่ 2

จากการทดลองผลิตเชื้อ Bt ด้วยวิธีการพื้นบ้าน โดยใช้นมถั่วเหลืองอัตรา60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตรเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการผลิต 4 ครั้ง พบว่าในการผลิตครั้งที่ 1 ไม่สามารถตรวจนับปริมาณเชื้อ Bt และทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมได้ เนื่องจากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ 1 ชนิด ซึ่งมีเป็นจำนวนมาก ลักษณะของเชื้อที่ปนเปื้อนมีรูปร่างแบบแท่ง มีขนาดเล็กและสั้นกว่าเชื้อ Bt ลักษณะของ colony รูปร่างกลมขอบเรียบ ผิวมันวาว มีสีเหลืองใส ในการผลิตครั้งที่ 2 ได้ปริมาณเชื้อ 7.74×10^4 cfu/ml มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นจำนวน 2 ชนิด เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตาย 26.66 เปอร์เซ็นต์ ในการผลิตครั้งที่ 3 ได้ปริมาณเชื้อ 2.08×10^4 cfu/ml มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นจำนวน 2 ชนิด เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตาย 40.00 เปอร์เซ็นต์ และในการผลิตครั้งที่ 4 ได้ปริมาณเชื้อ 9.65×10^4 cfu/ml มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นจำนวน 2 ชนิด เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตาย 26.66 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 3) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ที่เข้ามาปนเปื้อนในการผลิตครั้งที่ 2, 3และ 4 จะมีลักษณะเหมือนกันในทุกครั้ง นั่นคือชนิดที่ 1 ลักษณะของเชื้อที่ปนเปื้อนจะมีรูปร่างแบบแท่ง มีขนาดเล็กและสั้นกว่าเชื้อ Bt ลักษณะของ colony รูปร่างกลมขอบเรียบ ผิวมันวาว มีสีเหลืองใส และชนิดที่ 2 เชื้อที่ปนเปื้อนมีรูปร่างเป็นแท่ง ปลายด้านหนึ่งโป่งบวมออกคล้ายไม้ขีดไฟ colony มีสีขาวขุ่น ผิวเรียบ

และจากการผลิตโดยใช้นมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการผลิตจำนวน 3 ครั้ง จากตาราง 4 พบว่าในการผลิตครั้งที่ 1 ได้ปริมาณเชื้อ 1.63×10^6 cfu/ml มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นจำนวน 1 ชนิด เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตาย 6.66 เปอร์เซ็นต์ ในการผลิตครั้งที่ 2 ได้ปริมาณเชื้อ 3.86×10^7 cfu/ml มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นจำนวน 1 ชนิด เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตาย 46.66 เปอร์เซ็นต์ และในการผลิตครั้งที่ 3 ได้ปริมาณเชื้อ 8.91 x

10^7 cfu/ml มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นจำนวน 1 ชนิด เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตาย 70.00 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เชื้อจุลินทรีย์ที่เข้ามาปนเปื้อนจะมีลักษณะเหมือนกันในการผลิตทุกครั้งคือมีรูปร่างแบบแท่ง มีขนาดเล็กและสั้นกว่าเชื้อ Bt ลักษณะของ colony รูปร่างกลมขอบเรียบ ผิวมันวาว

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาชนิดและปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่หาได้ง่ายโดยใช้วิธีการผลิตแบบมาตรฐาน และทำการฆ่าเชื้อที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี sterilization ก่อนที่จะนำมาใช้พบว่าการใช้นมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร สามารถนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี ไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยมีปริมาณเชื้อ Bt ที่ได้ 1.67 x x 10^8 cfu/ml และมีประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนกระทู้หอมวัย 2 ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และจากการใช้นมถั่วเหลืองอัตรา60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร และนมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาผลิตเชื้อ Bt ด้วยวิธีการพื้นบ้าน พบว่าได้ปริมาณเชื้อ Bt ต่ำ มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นและไม่มีประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนกระทู้หอม เนื่องจากเชื้อ Bt ที่ได้มีการสร้างสปอร์และผลึกสารพิษที่ไม่สมบูรณ์ และมีปริมาณเชื้อน้อยมากจนไม่สามารถฆ่าหนอนได้ นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ที่เข้ามาปนเปื้อนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้และผู้บริโภคได้

เอกสารอ้างอิง

อัจฉรา ตันติโชดก. 2533. แบคทีเรียควบคุมแมลงศัตรูพืช. หน้า 148-166. *ใน:* เอกสารวิชาการการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชากาเกษตร.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2544. บีที การควบคุมแมลงศัตรูพืช. หน้า 184-208. *ใน:* เอกสารวิชาการการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

Hubei Acadamy of Agricultural Sciences. 1994. International Training Course on Bt (*Bacillus thuringiensis*) Production and Application. Wuhan, People Republic of China. October 25 – November 11, 1994.

Singer, S. and M.H. Rogoff. 1968. Inhibition of growth of *Bacillus thuringiensis* by amino acids in defined media. J. Inverte. Pathol. 19:98-104.

Suyanandana, P., W. Potacharoen, V. Arunpairojana, P. Boonsong, B. Fungsin, J. Vattanagul and P. Somchai. 1996. The production of *Bacillus thuringiensis* by solid state fermentation for public health and agricultural application. pp. 549-558. *In*: Proceedings of the Second Pacific RIM Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and Its Impact to the Environment. November 4-8, 1996. Chiang Mai, Thailand.

ตาราง 1 ปริมาณเชื้อ Bt ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดและอัตราส่วนต่างๆในการผลิตด้วยวิธีการมาตรฐาน

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อน้ำ 1 ลิตร	ปริมาณเชื้อ Bt (cfu/ml)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
นมถั่วเหลือง 20 มิลลิลิตร	2.68×10^8	7.03×10^8	4.85×10^8
นมถั่วเหลือง 40 มิลลิลิตร	3.81×10^8	2.85×10^8	3.33×10^8
นมถั่วเหลือง 60 มิลลิลิตร	2.04×10^9	5.86×10^8	1.29×10^9
นมถั่วเหลือง 80 มิลลิลิตร	3.3×10^8	2.23×10^8	4.41×10^8
นมผงสำเร็จรูป 4 กรัม	1.41×10^8	1.93×10^8	1.67×10^8
นมผงสำเร็จรูป 8 กรัม	1.5×10^7	1.23×10^6	5.86×10^7

ตาราง 2 ประสิทธิภาพของเชื้อ Bt ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดและอัตราส่วนต่างๆในการผลิตด้วยวิธีการมาตรฐาน ในการทดสอบกับหนอนกระทู้หอมวัย 2

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อน้ำ 1 ลิตร	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอม	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
นมถั่วเหลือง 20 มิลลิลิตร	56.66	-
นมถั่วเหลือง 40 มิลลิลิตร	23.33	-
นมถั่วเหลือง 60 มิลลิลิตร	53.33	-
นมถั่วเหลือง 80 มิลลิลิตร	23.33	-
นมผงสำเร็จรูป 4 กรัม	86.66	80.00
นมผงสำเร็จรูป 8 กรัม	53.33	60.00

ตาราง 3 แสดงปริมาณเชื้อ Bt การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นและประสิทธิภาพของเชื้อ Bt ที่ผลิตด้วยวิธีการแบบพื้นบ้านโดยใช้นมถั่วเหลืองอัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

การผลิตครั้งที่	ปริมาณเชื้อ (cfu/ml)	การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอม
1	-	พบ 1 ชนิด	-
2	7.74×10^{4}	พบ 2 ชนิด	26.66
3	2.08×10^{4}	พบ 2 ชนิด	40.00
4	9.65×10^{3}	พบ 2 ชนิด	26.66

ตาราง 4 แสดงปริมาณเชื้อ Bt การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นและประสิทธิภาพของเชื้อ Bt ที่ผลิตด้วยวิธีการแบบพื้นบ้านโดยใช้นมผงสำเร็จรูปอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

การผลิตครั้งที่	ปริมาณเชื้อ (cfu/ml)	การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอม
1	1.63×10^{6}	พบ 1 ชนิด	6.66
2	3.86×10^{7}	พบ 1 ชนิด	46.66
3	8.91×10^{7}	พบ 1 ชนิด	70.00