สำรวจและรวบรวมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ควบคุมแมลงศัตรูพืช

Survey, Collection and Identification of *Bacillus thuringiensis*

อิศเรส เทียนทัด ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ อัจฉรา ตันติโชดก
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างดินจากจังหวัดต่างๆ ทั่วประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจากจังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น อุดรธานี หนองคาย หนองบัวลำภู สระแก้วและสระบุรี จำนวน 523 ตัวอย่าง ได้เชื้อ Bt isolate จำนวน 664 isolates ภาคตะวันตกจากจังหวัดกาญจนบุรี เพชรบุรีและราชบุรี จำนวน 71 ตัวอย่าง ได้เชื้อ Bt isolate จำนวน 114 isolates ภาคกลางจากจังหวัดนครปฐม อุทัยธานี สุพรรณบุรี ลพบุรีและนครนายก จำนวน 117 ตัวอย่าง ได้เชื้อ Bt isolate จำนวน 75 isolates ภาคใต้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ชุมพร ระนอง พังงาและภูเก็ต จำนวน 51 ตัวอย่าง ได้เชื้อ Bt isolate จำนวน 39 isolates ภาคเหนือจากจังหวัดเชียงใหม่ เพชรบูรณ์และตาก จำนวน 164 ตัวอย่าง ได้เชื้อ Bt isolate จำนวน 252 isolates รวมได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 926 ตัวอย่าง พบเชื้อ Bt isolate ทั้งหมด 1,144 isolates จากนั้นนำเชื้อ Bt isolate ที่แยกได้จากตัวอย่างดินทั้งหมดมาทำการทดสอบประสิทธิภาพ (insecticidal activity) กับหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผัก พบ Bt isolate ที่สามารถทำให้หนอนกระทู้หอมตายได้ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีจำนวน 49 isolates โดยเป็นเชื้อ Bt isolate ที่ได้จากจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 4 isolates จากจังหวัดหนองคาย 1 isolate จากจังหวัดนครนายก 4 isolates จากจังหวัดนครราชสีมา 15 isolates จากจังหวัดสระแก้ว 4 isolates จากจังหวัดสระบุรี 4 จากจังหวัดตาก 5 isolates และจากจังหวัดอุดรธานี จำนวน 7 isolates และจากเชื้อ Bt isolate จำนวน 1,144 isolates เมื่อนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก พบ Bt isolate ที่สามารถทำให้หนอนกระทู้ผักตายได้ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีจำนวน 104 isolates โดยเป็นเชื้อ Bt isolate ที่ได้จากจังหวัดชุมพร 2 isolates จากจังหวัดชัยภูมิ 2 isolates จากจังหวัดขอนแก่น 5 isolates จากจังหวัดลพบุรี 1 isolate จากจังหวัดหนองคาย 9 isolates จากจังหวัดนครราชสีมา 31 isolates จากจังหวัดเพชรบุรี 29 isolates จากจังหวัดภูเก็ต 2 isolates จากจังหวัดราชบุรี 3 isolates จากจังหวัดสระแก้ว 2 isolates จากจังหวัดสระบุรี 2 isolates จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี 2 isolates และจากจังหวัดอุดรธานี 14 isolates

รหัสการทดลอง 09-02-49-01-02-01-17-49

คำนำ

ปัจจุบันทุกฝ่ายได้ตระหนักถึงอันตรายจากสารฆ่าแมลงที่มีต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค ตลอดจนผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม จากการเข้าเป็นสมาชิกองค์การการค้าโลกประเทศไทยต้องปฏิบัติตามข้อตกลง ที่ว่าด้วยการใช้มาตราการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phyto-sanitary Measures (SPS) โดยใช้สุขอนามัยผู้บริโภคและปริมาณสารพิษตกค้างของพืชผักและผลไม้เป็นตัวกำหนดคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ประเทศไทยจึงได้รับผลกระทบโดยตรง เนื่องจากมีการใช้สารเคมีควบคุมศัตรูพืชมาก ปริมาณพิษตกค้างบนผลิตภัณฑ์มักพบว่าสูงเกินค่าความปลอดภัยอยู่เสมอเป็นผลให้ผลิตภัณฑ์ไม่ได้คุณภาพตามที่ต้องการ ทำให้ไม่สามารถส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศได้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ดำเนินการที่จะลดปัญหาดังกล่าวโดยการห้ามการจำหน่ายสารฆ่าแมลงที่มีฤทธิ์รุนแรงและมีฤทธิ์ตกค้างนาน ให้มีการตรวจสอบและออกใบรับรองพืช 12 ชนิด ที่พบว่ามีพิษตกค้างสูงก่อนที่จะส่งออกไปต่างประเทศ เพื่อลดปัญหาดังกล่าวการค้นคว้าวิจัยและพัฒนาเพื่อนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชทดแทนสารเคมีกำจัดแมลง จึงเป็นสิ่งที่จำเป็น เพื่อให้เกษตรกรได้มีทางเลือกนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เชื้อ *Bacillus thuringiensis* เป็นจุลินทรีย์ที่พบในประเทศไทย มีความเฉพาะเจาะจงสูงต่อแมลงเป้าหมาย ปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์ แมลงศัตรูธรรมชาติและแมลงที่มีประโยชน์และต่อสิ่งแวดล้อม ได้ผ่านการทดสอบจาก US Environmental Protection Agency ประเทศสหรัฐอเมริกาและเป็นที่ยอมรับและนำไปใช้ในประเทศที่พัฒนาแล้ว การนำเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จะช่วยแก้ปัญหาผลกระทบของสารเคมีกำจัดแมลงต่อประชาชน ทำให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้เพื่อผลิตพืชที่ได้คุณภาพผลผลิตไม่ลดลงและต้นทุนการผลิตไม่เพิ่มขึ้น

ในปัจจุบันจากการค้นคว้าวิจัยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* พบว่าสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ดีที่สุด และพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้อยู่ในรูปของจุลินทรีย์ที่ควบคุมแมลงศัตรูพืช (microbial insecticide) ได้ เช่น เชื้อ *Bacillus sphaericus* สร้างสารพิษที่ผนังเซลล์ซึ่งเป็นพิษกับลูกน้ำยุงวงศ์ Culicidae เชื้อ *Bacillus popiliae* ทำให้เกิดโรคกับ Japanese beetle grub โดยเชื้อทำให้ตัวอ่อนของด้วงเป็นโรค มีลำตัวสีขาวขุ่นและตายในลักษณะที่เรียกว่า milky disease เชื้อ *Bacillu moritai* ทำให้เกิดโรคกับแมลงในอันดับ Diptera เช่น แมลงวันบ้าน เชื้อ *Bacillus thuringiensis* ที่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น หนอนใยผัก หนอนกระทู้หอม เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* จัดเป็นเชื้อจุลินทรีย์โรคแมลงที่มีการค้นคว้ามากที่สุด และมีการผลิตนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิดทั่วโลก คือ *Bacillus thuringiensis* เนื่องจากเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการค้นพบและได้แสดงศักยภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชมานานแล้ว มีคุณลักษณะครบถ้วนทุกประการเหมาะกับการเป็น microbial insecticide เชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* หรือเชื้อ Bt เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ในกลุ่ม endospore forming rods and cocci อยู่ในสกุล *Bacillus* วงศ์ Bacillaceae (ดวงพร, 2537) เซลล์มีรูปร่างแบบแท่ง ยาว 3-5 ไมครอน (Bajwa and Kogan, 2005) ถ้านำมาเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อ ลักษณะโคโลนี (colony) มีสีขาวขุ่น

ขนาดของโคโลนีค่อนข้างใหญ่ (5-10 มิลลิเมตร) ผิวหน้าไม่เรียบและไม่เป็นมัน (อัจฉรา, 2544) เชื้อ Bt พบได้ทั่วไปในสภาพธรรมชาติ เช่น ในดิน ซึ่งตามปกติอยู่ในรูปของสปอร์ ถ้ามีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะเจริญเติบโตต่อไปอยู่ในระยะ vegetative นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อได้บนพืช ในน้ำ ในมูลสัตว์ (Porcar and Caballero, 2000) รวมทั้งในแมลงที่ตายแล้วหรือใกล้ตายอีกด้วย (Travers *et al*., 1987) แต่จากการศึกษาของ Theunis *et al*. (1998) พบว่า จะพบเชื้อ Bt พบอยู่ในดินมากที่สุด โดยเฉพาะในเนื้อดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูง นอกจากดินที่เก็บรวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ มักมีจำนวน Bt isolates แตกต่างกันอาศัยร่วมกันอย่างหลากหลาย ซึ่งดินในทวีปเอเชียจะมีจำนวน Bt isolates มากกว่าดินในทวีปอื่น ๆ (Martin and Travers, 1989) Bt จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูง สามารถใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ และแมลงสาธารณสุขบางชนิด ในอันดับ Lepidoptera เช่น หนอนกระทู้หอม หนอนใยผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกินใบปาล์ม เป็นต้น อันดับ Coleoptera เช่น ด้วงหมัดผัก และ อันดับ Diptera เช่น ยุง เป็นต้น (อัจฉรา, 2544) จากความรู้และข้อมูลพื้นฐานดังกล่าวทำให้นักวิจัยจากหลายประเทศทำการศึกษารวบรวมเชื้อ Bt จากแหล่งต่าง ๆ เพื่อให้ได้ Bt สายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตผลึกโปรตีนได้หลายชนิด และมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงได้หลากหลายไปพร้อมกัน ดังเช่นจากการศึกษาของ Lee *et al*. (2001) พบว่า Bt ที่แยกออกจากดินในประเทศสาธารณรัฐเกาหลีบาง isolate มีการสร้างผลึกโปรตีนขึ้นหลายชนิด มีความเป็นพิษสูง ต่อหนอนกระทู้หอมและรวมทั้งลูกน้ำยุง *Culex pipiens* ด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ถุงพลาสติกเก็บตัวอย่าง
2. ตู้เขี่ยเชื้อ
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth และ nutrient agar
4. หนอนกระทู้หอม
5. หนอนกระทู้ผัก

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างดินและการแยกเชื้อออกจากตัวอย่างดิน

1.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

ทำการสำรวจสุ่มเก็บตัวอย่างดินด้วยวิธี simple random sampling จากพื้นที่ที่ไม่ได้ทำการเกษตรในแหล่งต่าง ๆ ตามธรรมชาติของประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างดินด้วยวิธีของ Attathom *et al*. (1996) โดยเก็บดินที่ความลึก 3-5 เซนติเมตรจากผิวหน้าดิน และบรรจุในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บันทึกวันและสถานที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างดินมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำดินเพื่อไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

1.2. การแยกเชื้อออกจากตัวอย่างดิน

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียออกจากเชื้ออื่นที่ปะปนอยู่ในดิน โดยนำตัวอย่างดินจำนวน 1 กรัม ผสมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร ภายในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (sterile distilled water) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง mixer นาน 5 นาที เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์กระจายตัวและแยกชั้นออกจากดิน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เพื่อให้ดินตกตะกอน แล้วเทน้ำใสที่อยู่ส่วนบนใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก็จะได้สารละลายดิน นำสารละลายดินมาเจือจางลง 10 เท่า (serial dilution) ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 9:1 โดยใช้น้ำกลั่นจำนวน 1.8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายดินจำนวน 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นจนได้สารละลายดินที่ความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ สำหรับทำการ spread plate เพื่อแยกเชื้อต่อไป เตรียมอาหารวุ้นสำหรับการ spread plate โดยใช้ nutrient agar อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 1,000 มิลลิลิตร นำมาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน15ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15นาที แล้วเทใส่ในจานแก้ว (petri dish) อาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บไว้ใน incubator ปล่อยให้ผิวหน้าอาหารแห้งจึงจะนำไปใช้ จากนั้นนำสารละลายดินที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} มาทำการ spread plate โดยหยดสารละลายดินจำนวน 100 ไมโครลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ เกลี่ยด้วยแท่งแก้ว และนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเลือกเก็บกลุ่มเชื้อ (colony) ที่มีลักษณะขาวขุ่น ขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีด้านไม่เป็นมันวาว และมีขอบไม่เรียบ ซึ่งเป็นลักษณะของโคโลนีเชื้อ Bt บันทึกผลจำนวนเชื้อ Bt isolate ที่ได้ในแต่ละตัวอย่างดินที่เก็บมา จากนั้นนำกลุ่มเชื้อที่แน่ใจว่าเป็นเชื้อ Bt เขี่ยลงในหลอดอาหารเอียง (slant agar) และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ Bt isolate

ใช้วิธีการทดสอบประสิทธิภาพ (insecticidal activity) เพื่อทำการคัดเลือกเชื้อ Bt isolate ที่สามารถฆ่าหนอนได้ โดยทำการทดสอบด้วยวิธีการ diet plug method โดยทำการทดสอบ isolate ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว โดยเลี้ยงเชื้อ Bt isolate บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ว ทำการผสมเชื้อ Bt isolate ปริมาณ 4 loopfull ต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ทำการเจาะอาหารเทียมเลี้ยงแมลงด้วยที่เจาะจุกคอร์กเบอร์ 1 ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 มิลลิเมตร สูง 3 มิลลิเมตร วางบนจานอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นหยดสารละลายเชื้อ Bt ที่เตรียมไว้ลงบนก้อนอาหารเทียม ก้อนละ 5 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง คัดเลือกหนอนวัย 2 ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน และปล่อยให้อดอาหารประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อเตรียมไว้สำหรับทำการทดสอบ หลังจากนั้นนำอาหารเทียมที่หยดเชื้อแล้วใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 3 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขี่ยหนอนทดลอง ลงในหลอด หลอดละ 1 ตัว จากนั้นบันทึกผลการตายทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดินและการแยกเชื้อออกจากตัวอย่างดิน

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ทั่วประเทศ โดยเก็บอยู่ในถุงพลาสติกเก็บตัวอย่าง (ภาพ 1) จากนั้นทำการแยกเชื้อ Bt ออกจากตัวอย่างดินด้วยวิธี spread plate คัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีด้านไม่เป็นมันวาว และมีขอบไม่เรียบ ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ Bt (ภาพ 2) จากนั้นนำ โคโลนีที่คัดเลือกได้มาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยของเชื้อด้วยการตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งถ้าเป็นเชื้อ Bt จะพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นท่อนตรง มีผลึกโปรตีน และสปอร์อยู่ภายในเซลล์ (ภาพ 3) จากนั้นนำโคโลนีของเชื้อ Bt ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate เก็บส่วนหนึ่งไว้ใน slant agar เพื่อใช้สำหรับศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าหนอน จากตาราง 1 ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 8 จังหวัด ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 523 ตัวอย่าง เมื่อนำมาแยกเชื้อ Bt ได้ 664 isolates ซึ่งสามารถแยกเชื้อ Bt ออกตัวอย่างดินได้ 7 จังหวัดคือ นครราชสีมา ชัยภูมิ อุดรธานี ขอนแก่นหนองคาย สระแก้วและสระบุรี โดยที่จังหวัดหนองบัวลำภูไม่พบเชื้อ Bt อยู่ในตัวอย่างดินที่เก็บ จากตาราง 2 ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินในภาคตะวันตกจำนวน 3 จังหวัด ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 71 ตัวอย่าง เมื่อนำมาแยกเชื้อ Bt ได้ 114 isolates ซึ่งสามารถแยกเชื้อ Bt ได้ทุกจังหวัดคือ กาญจนบุรี เพชรบุรีและราชบุรี ในตาราง 3 ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินในภาคกลาง จำนวน 5 จังหวัด ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 117 ตัวอย่าง เมื่อนำมาแยกเชื้อ Bt ได้ 75 isolates ซึ่งสามารถแยกเชื้อ Bt ได้ 2 จังหวัดคือ ลพบุรีและนครนายก ส่วนอีก 3 จังหวัดไม่พบเชื้อ Bt อยู่ในตัวอย่างดินคือ นครปฐม อุทัยธานีและสุพรรณบุรี จากตาราง 4 ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินในภาคใต้ จำนวน 5 จังหวัด ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 51 ตัวอย่าง เมื่อนำมาแยกเชื้อ Bt ได้ 39 isolates ซึ่งสามารถแยกเชื้อ Bt ได้ 4 จังหวัดคือ สุราษฎร์ธานี ชุมพร พังงาและภูเก็ต โดยที่จังหวัดระนองไม่พบเชื้อ Bt อยู่ในตัวอย่างดิน และได้ทำการเก็บตัวอย่างดินในภาคเหนือจำนวน 3 จังหวัด คือ เชียงใหม่ เพชรบูรณ์และตาก ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 164 ตัวอย่าง เมื่อนำมาแยกเชื้อ Bt ได้ 252 isolates ซึ่งสามารถแยกเชื้อ Bt ได้ 2 จังหวัดคือ เชียงใหม่และตาก ส่วนจังหวัดเพชรบูรณ์ไม่พบเชื้อ Bt อยู่ในตัวอย่างดิน (ตาราง 5) และจากการเก็บตัวอย่างดินในจังหวัดต่างๆ ทั่วประเทศ จำนวน 926 ตัวอย่าง ได้เชื้อ Bt isolate ทั้งหมด 1,144 isolates เมื่อนำจำนวน Bt isolate และจำนวนตัวอย่างดินมาหาอัตราส่วนกัน พบว่าตัวอย่างดินที่เก็บมาจากจังหวัดอุดรธานีมีอัตราส่วนจำนวน Bt isolate ต่อจำนวนตัวอย่างดินมากที่สุด มีอัตราส่วนเท่ากับ 4.18 ซึ่งแสดงว่าในตัวอย่างดิน 1 ตัวอย่างจะพบเชื้อ Bt 4.18 isolates และจังหวัดที่มีอัตราส่วนจำนวน Bt isolate ต่อจำนวนตัวอย่างดิน มากกว่า 2 คือจังหวัดนครราชสีมา เพชรบุรี ภูเก็ตและหนองคาย ซึ่งมีอัตราส่วนเท่ากับ 3.17, 2.97, 2.75 และ 2.00 ตามลำดับ (ตาราง 6)

จากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากในจังหวัดต่าง ๆ พบว่า ดินที่มีลักษณะร่วนซุย ในเนื้อดินมีอินทรีย์วัตถุอยู่สูง จะสามารถทำการแยกเชื้อ Bt ออกมาได้มาก ส่วนดินเหนียวหรือดินปนทรายจะพบ

เชื้อ Bt อยู่น้อยมากหรือไม่พบเลย และลักษณะดินที่ไม่สามารถแยกเชื้อ Bt ออกมาได้ เป็นดินลูกรัง หรือดินที่มีหินปะปนอยู่มากและเนื้อดินแห้งมีความชื้นอยู่ในเนื้อดินต่ำมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของเพ็ญลักษณ์ และคณะ (2546) และ Theunis *et al*. (1998) ซึ่งพบว่า สามารถแยกเชื้อ Bt ได้มาจากดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง ในทำนองเดียวกัน Martin and Travers (1989) ได้รายงานว่า สภาพพื้นที่ที่มีลักษณะเป็นหาดทราย ทะเลทราย หรือดินที่อยู่ในชั้นดินลึก ๆ พบ Bt ได้น้อยมาก

2. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ Bt isolate

จากการทดสอบประสิทธิภาพ (insecticidal activity) โดยทำการทดสอบด้วยวิธีการ diet plug method ทำการทดสอบกับหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผักวัย 2 พบว่าจากการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ Bt isolate ที่ได้จำนวน 1,144 isolates พบ Bt isolate ที่สามารถทำให้หนอนกระทู้หอมตายได้ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีจำนวน 49 isolates โดยเป็นเชื้อ Bt isolate ที่ได้จากจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 4 isolates จากจังหวัดหนองคาย 1 isolate จากจังหวัดนครนายก 4 isolates จากจังหวัดนครราชสีมา 15 isolates จากจังหวัดสระแก้ว 4 isolates จากจังหวัดสระบุรี 4 จากจังหวัดตาก 5 isolates และจากจังหวัดอุดรธานี จำนวน 7 isolates (ตาราง 7) และจากเชื้อ Bt isolate จำนวน 1,144 isolatesเมื่อนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก พบ Bt isolate ที่สามารถทำให้หนอนกระทู้ผักตายได้ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีจำนวน 104 isolates โดยเป็นเชื้อ Bt isolate ที่ได้จากจังหวัดชุมพร 2 isolates จากจังหวัดชัยภูมิ 2 isolates จากจังหวัดขอนแก่น 5 isolates จากจังหวัดลพบุรี 1 isolate จากจังหวัดหนองคาย 9 isolates จากจังหวัดนครราชสีมา 31 isolates จากจังหวัดเพชรบุรี 29 isolates จากจังหวัดภูเก็ต 2 isolates จากจังหวัดราชบุรี 3 isolates จากจังหวัดสระแก้ว 2 isolates จากจังหวัดสระบุรี 2 isolates จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี 2 isolates และจากจังหวัดอุดรธานี 14 isolates (ตาราง 8)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างดินจากจังหวัดต่างๆ ทั่วประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจากจังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น อุดรธานี หนองคาย หนองบัวลำภู สระแก้วและสระบุรี จำนวน 523 ตัวอย่าง ได้เชื้อ Bt isolate จำนวน 664 isolates ภาคตะวันตกจากจังหวัดกาญจนบุรี เพชรบุรีและราชบุรี จำนวน 71 ตัวอย่าง ได้เชื้อ Bt isolate จำนวน 114 isolates ภาคกลางจากจังหวัดนครปฐม อุทัยธานี สุพรรณบุรี ลพบุรีและนครนายก จำนวน 117 ตัวอย่าง ได้เชื้อ Bt isolate จำนวน 75 isolates ภาคใต้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ชุมพร ระนอง พังงาและภูเก็ต จำนวน 51 ตัวอย่าง ได้เชื้อ Bt isolate จำนวน 39 isolates ภาคเหนือจากจังหวัดเชียงใหม่ เพชรบูรณ์และตาก จำนวน 164 ตัวอย่าง ได้เชื้อ Bt isolate จำนวน 252 isolates รวมได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 926 ตัวอย่าง พบเชื้อ Bt isolate ทั้งหมด 1,144 isolates จากนั้นนำเชื้อ Bt isolate ที่แยกได้จากตัวอย่างดินทั้งหมดมาทำการทดสอบประสิทธิภาพ (insecticidal activity) กับหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผัก พบ Bt isolate ที่สามารถทำให้หนอนกระทู้หอมตายได้ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีจำนวน 49 isolates และเมื่อนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก พบ Bt isolate ที่สามารถทำให้หนอนกระทู้ผักตายได้ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีจำนวน 104 isolates

เอกสารอ้างอิง

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 202 หน้า.

เพ็ญลักษณ์ ชูดี, อัจฉรา ตันติโชดก และอุทัย เกตุนุติ. 2546. การจำแนกเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จากดินในประเทศไทย. ว. กีฏ. สัตว. 25(4): 258-270.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2544. บีที: การควบคุมแมลงศัตรูพืช. หน้า 183-208. *ใน*: การควบคุมแมลง ศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

Attathom, T., P. Isanont, R. Siriyan and W. Chongrattanameteekul. 1996. Isolation, PCR identification and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains in Thailand. pp. 82-102. *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.

Bajwa, I. W. and M. Kogan. 2005. *Bacillus thuringiensis*-based biological control of insect pests. (Online). Available: http://www.ippc.crst.edu/dir/microbial/bt (February 17, 2005).

Lee, I. H., Y. H. Je, J. H. Chang, J. Y. Roh, H. W. Oh, S. G. Lee, S. C. Shin and K. S. Boo. 2001. Isolation and characterization of a *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* strain toxic to *Spodoptera exigua* and *Culex pipiens*. Curr. Microbiol. 43(4): 284-287.

Porcar, M. and P. Caballero. 2000. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. J. Appl. Microbiol. 89(2): 309-316.

Martin, P. A. W. and R. S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 55(10): 2437-2442.

Theunis, W., R. M. Aguda, W. T. Cruz, C. Decock, M. Peferoen, B. Lambert, D. G. Bottrell, F. L. Gould, J. A. Litsinger and M. B. Cohen. 1998. *Bacillus thuringiensis* isolates from the Philippins: habitat distribution, delta-endotoxin diversity, and toxicity to rice stem borers (Lepidoptera: Pyralidae). Bull. Entomol. Res. 88(3): 335-342.

Travers, R. S., P. A. W. Martin and C. F. Reichelderfer. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol. 53(6): 1263-1266.

ตาราง 1 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดิน จำนวนตัวอย่างดินและจำนวน Bt isolateที่ได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จังหวัด	อำเภอ/สถานที่	จำนวนตัวอย่าง	จำนวน Bt isolate
นครราชสีมา	สีคิ้ว	1	8
	ด่านขุนทด	3	23
	อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่	12	148
	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช	113	233
	ชุมพวง	1	0
ชัยภูมิ	คอนสวรรค์	3	2
	คอนสาร	9	0
	เมือง	82	20
อุดรธานี	กุมภวาปี	2	14
	เมือง	9	32
ขอนแก่น	น้ำพอง	2	11
	เขาสวนกวาง	2	4
	บ้านไผ่	2	2
	พล	2	4
	เมือง	6	3
หนองคาย	สระใคร	2	2
	ท่าบ่อ	4	6
	ศรีเชียงใหม่	2	8
หนองบัวลำภู	โนนสัง	29	0
สระแก้ว	อุทยานแห่งชาติปางสีดา	96	52
สระบุรี	อุทยานแห่งชาติพระพุทธฉาย	64	45
	มวกเหล็ก	54	36
	พัฒนานิคม	22	11
รวม		523	664

ตาราง 2 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดิน จำนวนตัวอย่างดินและจำนวน Bt isolateที่ได้ในภาคตะวันตก

จังหวัด	อำเภอ/สถานที่	จำนวนตัวอย่าง	จำนวน Bt isolate
กาญจนบุรี	ศรีสวัสดิ์	11	3
	หนองปรือ	4	0
	เลาขวัญ	2	0
เพชรบุรี	อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน	26	89
ราชบุรี	สวนผึ้ง	24	22
รวม		71	114

ตาราง 3 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดิน จำนวนตัวอย่างดินและจำนวน Bt isolate ที่ได้ในภาคกลาง

จังหวัด	อำเภอ/สถานที่	จำนวนตัวอย่าง	จำนวน Bt isolate
นครปฐม	กำแพงแสน	5	0
อุทัยธานี	อุทยานแห่งชาติห้วยขาแข้ง	32	0
สุพรรณบุรี	อู่ทอง	2	0
ลพบุรี	สวนรุกขชาติน้ำตกวังก้านเหลือง	39	22
นครนายก	เมือง	39	53
รวม		117	75

ตาราง 4 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดิน จำนวนตัวอย่างดินและจำนวน Bt isolate ที่ได้ในภาคใต้

จังหวัด	อำเภอ/สถานที่	จำนวนตัวอย่าง	จำนวน Bt isolate
สุราษฎร์ธานี	สวนป่ารัชชประภา	14	11
	อุทยานแห่งชาติเขาสก	14	2
	พนม	5	4
ชุมพร	พะโต๊ะ	6	6
ระนอง	สุขสำราญ	4	0
พังงา	ตะกั่วป่า	4	5
ภูเก็ต	ถลาง	4	11
รวม		51	39

ตาราง 5 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดิน จำนวนตัวอย่างดินและจำนวน Bt isolate ที่ได้ในภาคเหนือ

จังหวัด	อำเภอ/สถานที่	จำนวนตัวอย่าง	จำนวน Bt isolate
เชียงใหม่	เมือง	21	59
	จอมทอง	15	54
	เชียงดาว	9	0
	แม่แตง	12	0
	ฝาง	12	16
	แม่อาย	12	5
	พร้าว	15	4
	สันทราย	18	64
	หางดง	15	6
	ไชยปราการ	9	0
เพชรบูรณ์	เขาค้อ	7	0
ตาก	พบพระ	19	34
รวม		164	252

ตาราง 6 จำนวน Bt isolate ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในจังหวัดต่าง ๆ

จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง	จำนวน Bt isolate	จำนวน Bt isolate/ตัวอย่างดิน
นครราชสีมา	130	412	3.17
ชัยภูมิ	94	22	0.23
อุดรธานี	11	46	4.18
ขอนแก่น	14	24	1.71
หนองคาย	8	16	2.00
หนองบัวลำภู	29	0	0
สระแก้ว	96	52	0.54
สระบุรี	140	92	0.65
กาญจนบุรี	17	3	0.17
เพชรบุรี	30	89	2.97
ราชบุรี	24	22	0.92
นครปฐม	5	0	0
อุทัยธานี	32	0	0
สุพรรณบุรี	2	0	0
ลพบุรี	39	22	0.56
นครนายก	39	53	1.36
สุราษฎร์ธานี	33	17	0.51
ชุมพร	6	6	1.00
ระนอง	4	0	0
พังงา	4	5	1.25
ภูเก็ต	4	11	2.75
เชียงใหม่	138	218	1.56
เพชรบูรณ์	7	0	0
ตาก	19	34	1.79
รวม	926	1,144	เฉลี่ย= 1.23

ตาราง 7 แสดง Bt isolate ที่ทำให้หนอนกระทู้หอมตายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

ลำดับ	Bt isolate	เปอร์เซ็นต์การตาย	ลำดับ	Bt isolate	เปอร์เซ็นต์การตาย
1	DAcm-m2(6)	95.00	30	DAsk 79-1(3)	94.72
2	DAcm-me3(1)	85.70	31	DAsk 80-1(1)	94.72
3	DAcm-ss1(3)	83.32	32	DAsk 80-1(3)	84.21
4	DAcm-ss6(5)	93.10	33	DAsk 83-2(2)	85.71
5	DAnk 26-1	86.20	34	DAsrb 198-2(2)	93.73
6	DAnkn 35-2(9)	80.76	35	DAsrb 198-2(3)	93.73
7	DAnkn 35-2(10)	88.46	36	DAsrb 334-1(3)	94.72
8	DAnkn 36-2(3)	100	37	DAsrb 356-2(4)	100
9	DAnkn 55-1(34)	100	38	DAtak 167-1	81.25
10	DAnkr 2-2	82.14	39	DAtak 170-2(3)	80.94
11	DAnkr 187-1	90.00	40	DAtak 170-2(4)	90.47
12	DAnkr 190-9	83.32	41	DAtak 170-2(5)	100
13	DAnkr 190-13	94.42	42	DAtak 171-2(1)	90.47
14	DAnkr 190-14	100	43	DAud 12-1	85.70
15	DAnkr 190-15	86.66	44	DAud 14-7	93.10
16	DAnkr 191-6	85.00	45	DAud 14-14	93.10
17	DAnkr 191-7	93.33	46	DAud 14-15	86.20
18	DAnkr 191-8	81.00	47	DAud 14-17	96.54
19	DAnkr 192-4	89.99	48	DAud 21-2	82.75
20	DAnkr 192-8	100	49	DAud 23-4	86.20
21	DAnkr 194-1	100			
22	DAnkr 194-3	94.42			
23	DAnkr 247-13	89.28			
24	DAnkr 281-9	85.17			
25	DAphet 110-1	100			
26	DAphet 122-1	89.65			
27	DAphet 152-1	83.32			
28	DAphet 226-1	83.32			
29	DAphet 227-2	86.66			

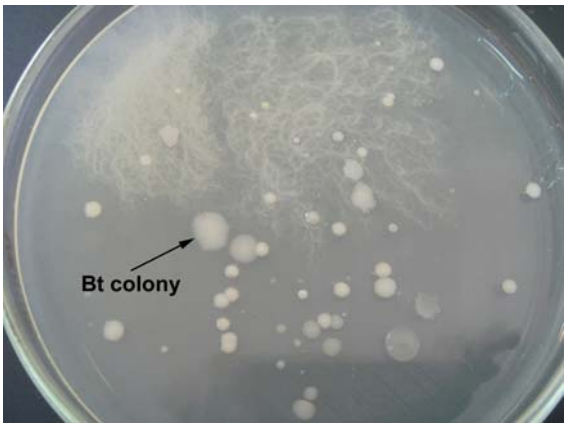
ตาราง 8 แสดง Bt isolate ที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

ลำดับ	Bt isolate	เปอร์เซ็นต์การตาย	ลำดับ	Bt isolate	เปอร์เซ็นต์การตาย
1	DAcp 168-1	80.76	30	DAnkr 190-8	89.66
2	DAcp 168-6	88.46	31	DAnkr 190-15	96.55
3	DAcyp 7-1	100	32	DAnkr 191-3	83.33
4	DAcyp 296	93.33	33	DAnkr 191-6	96.66
5	Dakk 10-1	83.33	34	DAnkr 191-7	89.65
6	Dakk 11-10	90.00	35	DAnkr 193-2	82.47
7	DAkk 32-1	100	36	DAnkr 193-4	89.66
8	DAkk 32-3	100	37	DAnkr 193-7	90.00
9	DAkk 34-2	100	38	DAnkr 193-8	82.75
10	DAlop 413	100	39	DAnkr 194-1	89.65
11	DAnk 20-2	96.66	40	DAnkr 194-2	86.66
12	DAnk 26-1	100	41	DAnkr 194-3	96.54
13	DAnk 26-2	100	42	DAnkr 194-6	100
14	DAnk 27-1	100	43	DAnkr 194-8	96.54
15	DAnk 27-2	100	44	DAnkr 194-12	96.54
16	DAnk 28-1	96.66	45	DAnkr 281-2	86.20
17	DAnk 29-1	100	46	DAnkr 281-4	96.54
18	DAnk 30-2	90.00	47	DAnkr 281-5	93.10
19	DAnk 30-6	100	48	DAnkr 281-6	89.65
20	DAnkr 2-1	92.33	49	DAnkr 281-8	96.54
21	DAnkr 2-15	86.66	50	DAnkr 281-9	89.65
22	DAnkr 3-1	100	51	DAphet 110-1	96.66
23	DAnkr 3-2	86.66	52	DAphet 112-4	90.00
24	DAnkr 4-1	80.25	53	DAphet 121-1	90.00
25	DAnkr 104-1	96.14	54	DAphet 122-2	100
26	DAnkr 104-2	100	55	DAphet 226-1	93.10
27	DAnkr 104-4	92.36	56	DAphet 227-1	96.54
28	DAnkr 187-1	88.46	57	DAphet 227-2	89.65
29	DAnkr 190-7	93.33	58	DAphet 227-4	81.47

ตาราง 8 (ต่อ)

ลำดับ	Bt isolate	เปอร์เซ็นต์การตาย
59	DAphet 227-5	92.58
60	DAphet 227-6	81.47
61	DAphet 227-7	81.47
62	DAphet 227-8	92.22
63	DAphet 227-9	81.47
64	DAphet 227-10	81.47
65	DAphet 227-11	81.47
66	DAphet 227-16	85.17
67	DAphet 228-5	81.00
68	DAphet 228-6	85.17
69	DAphet 228-9	86.66
70	DAphet 229-1	83.33
71	DAphet 229-12	85.17
72	DAphet 229-13	85.17
73	DAphet 229-18	88.88
74	DAphet 229-23	96.66
75	DAphet 229-24	81.00
76	DAphet 230-1	86.66
77	DAphet 232-2	93.33
78	DAphet 232-5	96.66
79	DAphet 233-1	88.86
80	DAphu 180-1	92.30
81	DAphu 180-8	84.60
82	DArcb 320-3	96.66
83	DArcb 320-14	96.66
84	DArcb 320-20	86.66
85	DAsk 76	100
86	DAsk 78	100
87	DAsrb 199	100
88	DAsrb 410	100
89	DAsur 182-3	84.60
90	DAsur 182-4	84.60
91	DAud 12-2	83.33
92	DAud 14-4	93.33
93.	DAud 14-5	96.66
94	DAud 14-14	93.10
95	DAud 21-1	96.66
96	DAud 21-2	96.66
97	DAud 23-1	100
98	DAud 23-2	82.76
99	DAud 23-3	96.66
100	DAud 23-4	100
101	DAud 23-5	96.66
102	DAud 23-6	100
103	DAud 23-7	100
104	DAud 24-1	100

ภาพ 1 ถุงพลาสติกเก็บตัวอย่างดิน



ภาพ 2 โคโลนีของ เชื้อ Bt ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน

ภาพ 3 ลักษณะของ เชื้อ Bt ที่มีรูปร่างเป็นท่อนตรง มีสปอร์และผลึกโปรตีนอยู่ภายในเซลล์