ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตด้วยวิธีต่างๆ

Efficacy Study on Sub Culture of *Bacillus thuringiensis* for Insect Pests Control by Various Methods

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี อิศเรส เทียนทัด ภัทรพร สรรพนุเคราะห์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตด้วยวิธีต่างๆ โดยทดสอบการเพาะขยายเชื้อแบคทีเรีย บีที จากการใช้อาหารเหลว (submerged culture) และ อาหารแข็ง (solid state fermentation) ด้วยอาหารชนิดต่างๆที่หาได้ทั่วไป ผลการทดลองพบว่า การเพาะขยายเชื้อด้วยอาหารแข็ง ได้แก่ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์, ข้าวฟ่าง, ชานอ้อยผสมรำ และข้าวสุก มี Toatal cell count และ Spore count สูงกว่าการใช้อาหารเหลว โดยการเพาะขยายเชื้อด้วยอาหารแข็ง มี Toatal 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 Toatal cell count และ Spore count เฉลี่ยระหว่าง $4.5x10^{6}$-$3.2x10^{7}$ และ $3.3x10^{5}$-$1.2x10^{7}$ CFU/ml ตามลำดับ โดยเชื้อแบคทีเรียบีทีมาตรฐาน มี Toatal cell count และ Spore count เฉลี่ย $1.8x10^{10}$ และ $5.1x10^{9}$ CFU/ml เมื่อนำผลผลิตที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผัก วัย 2 ด้วย Feeding method บนอาหารเทียม พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ได้จาการเพาะขยายมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเชื้อแบคทีเรีย มาตรฐานอย่างชัดเจน มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ยระหว่าง 2.0-36.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแบคทีเรียบีทีมาตรฐาน มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์

คำนำ

การนำแบคทีเรีย บีที *Bacillus thuringiensis* มาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายประเทศ นอกจากมีประสิทธิภาพในการกำจัดตัวอ่อนของผีเสื้อชนิดต่างๆ แล้วมีความปลอดภัยสูงต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม และที่สำคัญแบคทีเรียชนิดนี้ไม่มีพิษตกค้างอยู่บนพืชเหมือนสารเคมีกำจัดแมลง (Dulmage, 1981; อัจฉรา, 2534) แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแกรมบวก (gram positive) ที่กอโรคในแมลง อยู่ในกลุมแบคทีเรีย facultative anaerobe มีรูปรางเซลลเปนทอน (rod shape) เคลื่อนที่ด่วยแฟลกเจลลาที่มีหลายเส่นรอบเซลล (peritrichous flagella) และสราง endospore อยู่ภายในเซลล์ สิ่งที่แตกตางจากกลุมแบคทีเรีย spore forming คือ ระหวางการสรางสปอรจะเกิด parasporal protein crystal ใน sporangium

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-02-02-01-54

โดยผลึกโปรตีนที่เรียกวา delta-endotoxin ซึ่งเป็นพิษกับแมลง (Entwistle และคณะ, 1993) จากข้อตกลงขององค์การค้าโลกประเทศไทยต้องปฏิบัติตามมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช ดังนั้นการผลิตพืชให้ได้คุณภาพและมีความปลอดภัยตามมาตรฐานที่ถูกกำหนดขึ้นส่งผลให้ไม่สามารถใช้สารเคมีกำจัดแมลงได้ตามที่เคยปฏิบัติในบางพืชโดยเฉพาะพืชส่งออกทั้งหลาย ดังนั้นการพัฒนาการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้ในประเทศมาใช้กำจัดโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย บีที จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งของการแก้ปัญหานี้ เพื่อใช้ทดแทนสารเคมีกำจัดแมลงในพืชชนิดต่างๆที่ประสบปัญหาการระบาดทำลายของแมลงศัตรูพืช (อัจฉราและคณะ, 2537) แต่ปัจจุบันพบว่ามีการแนะนำอย่างกว้างขวางให้เกษตรกรผลิตเชื้อไว้ใช้เองทั้งภาคเอกชนและภาครัฐ รวมถึงจากเกษตรกรด้วยกันเอง แม้ว่าจะเป็นสิ่งที่เป็นประโยชน์และสอดคล้องกับวิถีเกษตรพอเพียง แต่ก็เป็นไปในลักษณะลองผิดลองถูก ขาดข้อมูลวิชาการที่เพียงพอในการสนับสนุนวิธีปฏิบัติดังกล่าว ทำให้เกษตรกรสูญเสียทั้งเวลาและทรัพย์สินโดยไม่จำเป็น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาการเพาะขยายเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีต่างๆ รวมทั้งชนิดของสารอาหารที่ใช้เพาะขยาย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง มีประสิทธิภาพ ช่วยให้เกษตรกรสามารถนำไปปรับใช้ได้ด้วยตนเอง ซึ่งจะช่วยให้เกษตรกรสามารผลิตแบคทีเรีย บีที โดยวิธีง่ายๆ จากวัสดุอุปกรณ์ที่มีในท้องถิ่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ปั๊มลมเป่าอากาศขนาด 16 W (ความดัน 0.02Mpa, Output 25 L/min)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีต่างๆ ได้แก่ TSA, NA และ Nacl 0.85% w/v
3. วัตถุดิบที่ใช้ในการเพาะขยายเชื้อ ได้แก่ หางนม, นมข้นหวาน, น้ำมะพร้าว, ชานอ้อยอบแห้ง. รำ, ข้าวฟ่าง, ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และข้าวสุก
4. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการต่างๆ ได้แก่ ถ้วยแก้ว กระบอกตวง Flask และ Plate เป็นต้น
5. เชื้อแบคทีเรีย บีที (*Bacillus thuringiensis*) มาตรฐาน ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 53,000 SU/mg (เดลฟิน^{R}), และ เชื้อทั่วไป ได้แก่ หัวเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหมักขยาย (พลายแก้ว^{R})
6. หนอนกระทู้หอมวัย 2

วิธีการ การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเชื้อแบคทีเรีย Bt สูตรต่างๆ

1. ทำการผลิตเชื้อแบคีเรีย Bt ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

การเพาะขยายเชื้อแบคทีเรีย บีที โดยใช้ชีวภัณฑ์ที่จำหน่ายในท้องตลาด คือ เชื้อ *Bacillus thuringiensis* (เดลฟิน^{TM}) ผสมลงในสารอาหารชนิดต่างๆด้วยวิธีที่เกษตรกรปฏิบัติ ซึ่งแบ่งตามชนิดของอาหารที่ใช้เพาะขยายเชื้อเป็น 2 ประเภท คือ

1.1 ชนิดอาหารเหลว (submerged culture) ได้แก่ น้ำมะพร้าวอ่อน 1 ผลผสมไข่ไก่ 1 ฟอง และเชื้อ พลายแก้ว 45 กรัม และใช้ หางนม, นมข้นหวาน และน้ำมะพร้าว ผสมน้ำกลั่นสะอาดอัตราส่วนผสมโดยผสมอาหารต่อเชื้อแบคที่เรีย บีที (เดลฟิน®) ในอัตราส่วนน้ำ 10 ส่วนต่อเชื้อแบคทีเรีย บีที 1 ส่วน ใส่ในขวดพลาสติก ขนาด 2 ลิตร เป่าอากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นเวลา 48 ชม.

1.2 ชนิดอาหารแข็ง (solid state fermentation) ได้แก่ ชานอ้อยผสมรำข้าว ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวฟ่าง และข้าวสุก แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วจึง ผสมน้ำกลั่นสะอาดเพื่อเพิ่มความชื้นในอาหารอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปผสมกับเชื้อแบคที่เรีย บีที ในอัตราส่วนน้ำ 5 ส่วนต่อเชื้อแบคทีเรีย บีที 1 ส่วน คลุกเคล้าให้เข้าใส่ในถาดแล้วหุ้มด้วยถุงพลาสติกใส มัดปากไม่ต้องแน่น เพื่อให้อากาศผ่านได้ หมักเป็นเวลา 48 ชม. แล้วจึงนำไปแยกเอาเชื้อที่หมักได้ออกมา โดยผสมน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 : 1

2. นำเชื้อที่สกัดได้ไปตรวจนับจำนวนเซลล์ (Total cell count) โดยนำตัวอย่างเชื้อมาเจือจางแบบ serialiy dilution กับ sterile saline solution (0.85% w/v Nacl) ดูดสารละลายที่เจือจางนี้มา 0.1 ml แล้ว spread plate บนอาหร TSA บ่มเชื้อที่ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ แล้วจึงตรวจนับ colony หลังจากนั้นจึงตรวจนับจำนวนสปอร์ (Spore count) โดยนำ dilution ของเชื้อ Bt ที่ได้จากการนับโคโลนี มาให้ความร้อนบน water bath ที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 10 นาที แล้วนำขึ้นแช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที และจึงทำ spread plate บนอาหร TSA บ่มเชื้อที่ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกัน แล้วจึงตรวจนับ colony

3. ตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเข้ามาในระหว่างขบวนการผลิต

4. ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ Bt ที่ผลิตได้กับหนอนผีเสื้อศัตรูพืชที่สำคัญ ได้แก่ หนอนกระทู้ผัก ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Bioassay บนอาหารเทียม

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อ Bt ในแต่ละวิธีการผลิต
- ตรวจสอบและวิเคราะห์ปริมาณของ crystal toxin ที่เชื้อ Bt สร้างขึ้น
- บันทึกปริมาณและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในระหว่างขบวนการผลิต
- บันทึกประสิทธิภาพของเชื้อ Bt ที่ทำการทดสอบกับหนอนทดลองชนิดต่างๆ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา : ตุลาคม 2553 – กันยายน 2555

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการอาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตด้วยวิธีต่างๆนี้ พบว่าการเพาะขยายเชื้อที่แนะนำให้ใช้กันในกลุ่มของเกษตรกรนั้น ส่วนใหญ่ให้ผลผลิตของเชื้อค่อนข้างต่ำ โดยเชื้อแบคทีเรีย บีที มาตรฐาน ที่ใช้ในการทดลอง มีจำนวนโคโลนีสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ $1.8x10^{10}$ CFU/ml และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย บีที มาเพาะขยายด้วยอาหารชนิดต่างๆ พบว่า ได้จำนวนโคโลนีน้อยลงทุกชนิด โดยพบว่าเมื่อเพาะขยายเชื้อด้วย ข้าวฟ่าง, ชานอ้อยผสมรำ และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ $2.9x10^{8}$, $1.9xx10^{8}$ และ $1.7x10^{8}$ CFU/ml ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ ข้าวสุก นมข้นหวาน หางนม และน้ำมะพร้าว มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ $8.8x10^{7}$, $3.2x10^{7}$, $7.4x10^{6}$ และ $4.5x10^{6}$ CFU/ml ตามลำดับ ส่วนน้ำมะพร้าวผสมไข่ไก่และเชื้อพลายแก้ว ไม่สามารถตรวจนับโคโลนีได้เนื่องจากมีการปนเปื้อนค่อนข้างสูง

เมื่อนำไปตรวจนับจำนวนสปอร์พบว่า เชื้อที่ได้จากการเพาะขยายด้วยอาหารชนิดต่างๆมีจำนวนสปอร์ค่อนข้างต่ำกว่ามาตรฐานอย่างชัดเจน โดยเชื้อแบคทีเรีย บีที มาตรฐาน มีจำนวนสปอร์เฉลี่ย $5.1x10^{9}$ CFU/ml รองลงมา คือ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวสุก ข้าวฟ่าง น้ำมะพร้าว ชานอ้อยผสมรำ นมข้นหวาน หางนม และน้ำมะพร้าวผสมไข่ไก่ มีจำนวนสปอร์เฉลี่ย $8.4x10^{7}$, $2.4x10^{7}$, $1.8x10^{7}$, $1.2x10^{7}$, $1.1x10^{7}$, $6.5x10^{6}$, $4.0x10^{6}$ และ $3.3x10^{5}$ CFU/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนโคโลนีและสปอร์ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ที่มักด้วยอาหารชนิดต่างๆ

กรรมวิธี	Total cell count (CFU/ml)	Spore count (CFU/ml)
1. น้ำมะพร้าว+ไข่ไก่+เชื้อพลายแก้ว	Con.	$3.3x10^{5}$
2. น้ำมะพร้าว	$4.5x10^{6}$	$1.2x10^{7}$
3. นมข้นหวาน	$3.2x10^{7}$	$6.5x10^{6}$
4.หางนม	$7.4x10^{6}$	$4.0x10^{6}$
5.ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์	$1.7x10^{8}$	$8.4x10^{7}$
6.ข้าวฟ่าง	$2.9x10^{8}$	$1.8x10^{7}$
7.ชานอ้อย + รำ	$1.9xx10^{8}$	$1.1x10^{7}$
8.ข้าวสุก	$8.8x10^{7}$	$2.4x10^{7}$
9.ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย บีที (เดลฟิน^{R})	$1.8x10^{10}$	$5.1x10^{9}$

Con. = Contaminate

เมื่อนำผลผลิตจากการเพาะขยายเชื้อไปทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย บีที กับหนอนกระทู้ผักวัย 2 พบว่า ทุกกรรมวิธีมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผักค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับแบคทีเรีย บีที มาตรฐาน โดยแบคทีเรีย บีที มาตรฐาน ที่มีจำนวนหนอนตายสูงที่สุดเฉลี่ย 30 ตัวต่อกรรมวิธี เมื่อครบ 7 วัน และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่เหลือที่มีจำนวนหนอนตายค่อนข้างต่ำอย่างชัดเจน โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่เพาะขยายจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มีจำนวนหนอนกระทู้ผักตายรองลงมาเฉลี่ย 11.0 ตัว ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับเชื้อแบคทีเรียที่เพาะขยายจากน้ำมะพร้าว, น้ำมะพร้าวผสมไข่ไก่, ข้าวสุก และ ชานอ้อยผสมรำ ที่พบจำนวนหนอนตายเฉลี่ย 6.7, 5.0, 4.0, และ 2.0 ตัวต่อกรรมวิธีตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่เพาะขยายจาก นมข้นหวาน, หางนม และข้าวฟ่าง มีจำนวนหนอนตายเฉลี่ย 1.0 ตัวเท่ากันหมดและไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่พบหนอนตาย (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนและเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักวัย 2 จากแบคทีเรีย บีที ที่ผลิตโดยวิธีต่างๆ

กรรรมวิธี	อัตรา (มล./น้ำ 20 ลิตร)	จำนวนหนอนตายเฉลี่ย 1/ (ตัว)	เปอร์เซ็นต์หนอนตาย (%)
1. น้ำมะพร้าว+ไข่ไก่+เชื้อพลายแก้ว	200	5.0 c	16.7
2. น้ำมะพร้าว	200	6.7 bc	2.0
3. นมข้นหวาน	200	1.0 d	3.3
4. หางนม	100	1.0 d	3.3
5. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์	200	11.0 b	36.7
6. ข้าวฟ่าง	150	1.0 d	3.3
7. ชานอ้อย + รำ	200	2.0 cd	6.7
8. ข้าวสุก	200	4.0 c	13.3
9. ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย บีที (เดลฟิน®)	80	30.0 a	100.0
10. น้ำกลั่น	-	0 d	0
C.V. (100 %)	-	32.52	-

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองเห็นได้ว่าการเพาะขยายเชื้อแบคทีเรีย บีที ที่เกษตรกรปฏิบัติกัน ได้ผลผลิตของเชื้อที่ค่อนข้างต่ำ เมื่อพิจารณาจากจำนวนโคโลนีและสปอร์หลังการหมักนาน 48 ชม. พบว่าจำนวนโคโลนีและสปอร์จากการหมักด้วยสูตรอาหารต่างๆแตกต่างจากเชื้อมาตรฐานถึง 100 เท่า (ตารางที่ 1) และจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ พบว่าการเพาะขยายเชื้อด้วยอาหารชนิดต่างๆ มีประสิทธิภาพต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ทุกกรรมวิธี (ตารางที่ 2) นอกจากนี้การดำเนินการเพาะขยายเชื้อในการทดลองนี้ ได้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการที่ค่อนข้างปลอดเชื้อ แต่สำหรับเกษตรกรทั่วไปอาจไม่สามารถดำเนินการเช่นนี้ได้ จึงมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่นค่อนข้างสูง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เชื้อแบคทีเรีย บีที *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตแบบชนิดอาหารเหลว (submerged culture) และชนิดอาหารแข็ง (solid state fermentation) ด้วยอาหารชนิดต่างๆ พบว่ามีผลผลิตของเชื้อและประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผักค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียบีทีมาตรฐาน ที่จำหน่ายเป็นการค้า ดังนั้นการนำเชื้อไปเพาะขยายต่อไว้ใช้เองอาจไม่คุ้มค่าการลงทุน แต่อาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่พึงประสงค์ได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณธนศักดิ์ ตั้งผาติ เกษตรกรอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก และบริษัท แองโกล ไทย เคมีคัล ซัพพลายส์ จก. ที่ให้ความอนุเคราะห์สูตรการเพาะขยายเชื้อด้วยหางนม และ ชีวภัณฑ์ แบคทีเรีย บีที

เอกสารอ้างอิง

Dulmage, H. T. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their Potential for pest control. pp. 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. 239-267.

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

อัจฉรา ตันติโชดก. 2537. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย. หน้า 9-37. *ใน* : การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา และสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่. กรมวิชาการเกษตร.