สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการเติบโตและกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis*

T047311

นางสาวอุษณีย์ ยิ่งยงทรัพย์มั่น
นางสาวอุษา สิทธารถ
นางสาวเอื้อมพร ศิริพันธ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2545

เลขหมู่
เลขทะเบียน 47311
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2546
b
1

ลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Studies on Growth and Enzyme Activity of *Bacillus thuringiensis*

Miss Ussanee Yingyongsapman

Miss Usa Sittharod

Miss Auamporn Siripan

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง การศึกษาการเติบโตและกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis*

นักศึกษา นางสาวอุษณีย์ ยิ่งยงทรัพย์มั่น

นางสาวอุษา สิทธารถ

นางสาวเอื้อมพร ศิริพันธ์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2545

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.วันชัย สุทธินุ่น	
กรรมการ	ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์	
กรรมการ	อาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง การศึกษาการเติบโตและกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis*

นักศึกษา นางสาวอุษณีย์ ยิ่งยงทรัพย์มั่น
นางสาวอุษา สิทธารถ
นางสาวเอื้อมพร ศิริพันธ์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2545
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* JC590 แบบเบ็ดเสร็จในอาหารเพาะเลี้ยงที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำอามิ – อามิ 3 ระดับ พบว่าความเข้มข้นของน้ำอามิ – อามิ ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ *B. thuringiensis* รหัส JC590 มีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* รหัส JC590 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ควบคุมอัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที อัตราการให้ อากาศ 1 vvm และพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.0 พบว่า *B. thuringiensis* รหัส JC590 เริ่มเข้าสู่ระยะการเติบโตคงที่ ณ ชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง

ทำการเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* รหัส JC590 ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีน้ำอามิ – อามิ และกลูโคสเป็นองค์ประกอบ โดยแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในถังหมักในช่วงเริ่มต้นของระยะการเติบโตคงที่ ณ ชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง 2 ระดับ คือ 50 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนละลายในถังหมัก 50 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมด (Q_p) และอัตราจำเพาะของการสร้างสปอร์ทั้งหมด (q_p) ดีกว่า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.899×10^{10} cfu*.l^{-1}.h^{-1} 0.0518 cfu*.cfu.h^{-1} ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Studies on Growth and Enzyme Activity of *Bacillus thuringiensis*
Name	Miss Ussanee Yingyongsapman
	Miss Usa Sittharod
	Miss Auamporn Siripan
Department	Applied Biology
Academic Year	2002
Program	Biotechnology
Special Project Advisor	Mr. Prasit Deewatthanawong

Abstract

Bacth culture of *Bacillus thuringiensis* stain no.JC590 was investigated in the basal medium containing ami-ami solution at various concentrations. The highest growth of *B. thuringiensis* stain no.JC590 was obtained from cultivation in medium with 10% ami-ami solutions. Cultivation of *B. thuringiensis* stain no.JC590 2 litre fermrnter (Biostat® B) which controlled agitation at 1,000 rpm, aeration 1.0 vvm and pH of medium at 7.00 showed initial stationary phase at 16 hrs. of cultivation.

Comparison of spore production of *B. thuringiensis* stain no.JC590 were studied in medium consist of ami-ami solution and glucose at different concentrations of dissolved oxygen. The results showed that at 50% dissolved oxygen gave maximum sporulation rate (Q_p) at 0.899×10^{10} cfu*.l^{-1}.h^{-1} , while specific sporulation rate (q_p) was 0.0518 cfu*.cfu^{-1}.h^{-1} .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษสำเร็จลุล่วงได้มาจากบุคคลหลายท่านที่ให้ความช่วยเหลือ คือ อาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ และร่วมทำโครงงานพิเศษ ดังกล่าวไปพร้อมๆกับนักศึกษา ผศ.วันชัย สุทธินุ่น และ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ ซึ่งเป็นประธานกรรมการ และคณะกรรมการ ที่มีส่วนในการให้กำลังใจในขณะทำโครงงานพิเศษฉบับนี้ ตลอดจนตรวจทานและแก้ไข ข้อผิดพลาดต่างๆ ผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.จริยา จันทร์ไพแสง ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่เอื้อเฟื้อความอนุเคราะห์เชื้อ *Bacillus thuringiensis* JC590 เพื่อใช้ในการทำโครงงานพิเศษ

นอกจากนี้ บริษัท อายิโนะโมโต๊ะ (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องน้ำอามิ-อามิ และ เพื่อนๆอีกหลายท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในระหว่างการทำโครงงานพิเศษ รวมไปถึงนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ต่างๆเพื่อใช้ในการทำโครงงานพิเศษ

ผู้จัดทำจึงใคร่ขอถือโอกาสนี้ขอบพระคุณทุกท่านทั้งที่ได้กล่าวนาม และ ไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย หากวิทยานิพนธ์นี้มีสิ่งใดที่ขาดตกบกพร่อง ผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนคุณความดีที่ปรากฏในโครงงานพิเศษฉบับนี้ ขอยกให้เป็นคุณความดีของผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นางสาว อุษณีย์ ยิ่งยงทรัพย์มั่น
นางสาว อุษา สิทธารถ
นางสาว เอื้อมพร ศิริพันธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	3
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	28
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	32
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	50
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก	58
ภาคผนวก ก	58
ภาคผนวก ข	60
ภาคผนวก ค	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจัดจำแนกของ *Bacillus thuringiensis* crystal Protein Genes	8
2	การจำแนกทาง Serology โดยอาศัยคุณลักษณะของ H-antigen ในการแบ่ง *B. thuringiensis* ออกเป็น subspecies	10
3	ผลิตภัณฑ์ของ *B. thuringiensis* ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด	27
4	พารามิเตอร์ที่ได้จากการศึกษาความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ ที่มีผลต่อการเติบโตของเชื้อ *B. thuringiensis* JC 590 ในระดับฟลาสก์	34
5	พารามิเตอร์ที่ได้จากการศึกษาสภาวะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC 590 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ควบคุมอัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และ พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง เท่ากับ 7.0	37
6	พารามิเตอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ การเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับถังหมักภายใต้สภาวะความเข้มข้น ของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังชั่วโมงที่ 16 ของ การเพาะเลี้ยงปรับเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.0	40
7	พารามิเตอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ การเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับถังหมักภายใต้สภาวะความเข้มข้น ของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังชั่วโมงที่ 16 ของ การเพาะเลี้ยงปรับเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.0	42
8	เปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะและอัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมด ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับถังหมักภายใต้สภาวะ ความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังชั่วโมงที่ 16 ของ การเพาะเลี้ยง ปรับเป็น 50 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง เท่ากับ 7.0	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
1	องค์ประกอบของน้ำอามิ-อามิ	59
2	ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ ต่อการเติบโตของเชื้อ *B. thuringiens* JC590 ในระดับฟลาสก์ ที่ 2.5 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ	69
3	ผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร ที่ควบคุมอัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และ พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.0	70
4	ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในถังหมัก ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง ปรับเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชของอาหารเท่ากับ 7.0	71
5	ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับถังหมัก ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง ปรับเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ พีเอชของอาหารเท่ากับ 7.00	72
6	ผลของวิธีการเก็บรักษาเชื้อ *B. thuiringiensis* JC590 ที่อุณหภูมิห้อง และ อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ในวันที่ 1 7 และ 37 ตามลำดับ	73
7	ผลของวิธีการเก็บรักษาเชื้อ *B. thuiringiensis* JC590 ที่อุณหภูมิห้อง และ อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ในวันที่ 1 7 และ 37 ตามลำดับ เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์	73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	*B. thuringiensis* ที่ทำให้เกิดโรคในแมลง	4
2	รูปร่างของโครงสร้าง 3 มิติ ของผลึกโปรตีน CryIIA. I II และ III ที่ถ่ายโดยใช้ X-ray Crystallography	5
3	แบบจำลองการทำให้เกิดช่องว่างภายในเยื่อหุ้มเซลล์กระเพาะอาหาร โดย crystal protein	6
4	การสร้างสายพันธุ์ *B. thuringiensis* ที่มีประสิทธิภาพควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด	19
5	การเจริญเติบโตของเซลล์ควบคู่ไปกับการสร้างสปอร์ และ crystal protein	22
6	ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ ในการเพาะเลี้ยงต่อการเติบโต การใช้น้ำตาลกลูโคส และ กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. thuringiensis* JC 590 ในระดับฟลาสก์ ที่ควบคุมความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0	33
7	ผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ควบคุมอัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ พีเอชของอาหารเท่ากับ 7.0	36
8	ผลการศึกษาการเติบโต การสร้างสปอร์ และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในถังหมัก 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงปรับเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเท่ากับ 7.0	38
9	ผลการศึกษาการเติบโต การสร้างสปอร์ และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในถังหมัก 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงปรับเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเท่ากับ 7.0	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	เปรียบเทียบอัตราการสร้างสปอร์จำเพาะและอัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมดในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับถังหมักโดยแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในถังหมัก 2 ระดับ ภายหลังชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง	44
11	การเก็บรักษาเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ที่อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 1 7 และ 37 ตามลำดับ	47
12	การเก็บรักษาเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส ในวันที่ 1 7 และ 37 ตามลำดับ	48
ภาพผนวกที่		
1	กราฟไทโรซีนมาตรฐาน	66
2	กราฟกลูโคสมาตรฐาน	68
3	อัตราการเติบโตจำเพาะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับฟลาสก์ ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ 2.5 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ	74
4	อัตราการเติบโตจำเพาะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร ที่ควบคุมอัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm	75
5	อัตราการเติบโตจำเพาะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับถังหมัก ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงปรับเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	76
6	อัตราการเติบโตจำเพาะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับถังหมัก ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงปรับเป็น 10 เปอร์เซ็นต์	77
7	เชื้อ *Bacillus thuringiensis* JC590 ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จากการ spread plate	79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
คำนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

Bacillus thuringiensis เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารพิษทำลายแมลงโดยเมื่อแมลงกินจะทำให้แมลงตาย ดังนั้น *B. thuringiensis* จึงมีการผลิตเพื่อใช้เป็น biopesticide อย่างกว้างขวาง *B. thuringiensis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่สามารถสร้างผลึกโปรตีน เรียกว่า "endotoxin protein" ในระหว่างการสร้างสปอร์ ผลึกโปรตีนดังกล่าว เป็นผลึกที่มีความจำเฉพาะเจาะจงต่อชนิดของแมลง

B. thuringiensis มีระยะการเจริญ 2 ระยะ คือ ระยะเจริญเติบโต (vegetative phase) และระยะการสร้างสปอร์ (sporogenic phase) โดยระหว่างการหมัก *B. thuringiensis* เริ่มแรกจะเพิ่มจำนวนในระยะเจริญเติบโต เมื่อสารอาหารถูกใช้หมด *B. thuringiensis* จะเข้าสู่ระยะการสร้างสปอร์ (sporulation phase) และผลึกโปรตีนที่เป็นสารพิษจะถูกสร้างขึ้นในระหว่างระยะนี้ ภายหลังสิ้นสุดการสร้างสปอร์ เซลล์จะแตกออกเพื่อปล่อยสปอร์และผลึกโปรตีนที่เป็นสารพิษ ขนาดของผลึกโปรตีนที่เป็นสารพิษอาจเท่ากับขนาดของสปอร์ โดยเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางว่าการสร้างผลึกโปรตีนที่เป็นสารพิษนั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสปอร์

การศึกษากระบวนการหมักได้มีผู้ศึกษาและทำการทดสอบได้ผลว่ากระบวนการหมักที่เหมาะสมนั้นจะมีความเกี่ยวข้องกับสารอาหารที่ต้องการ และ การยับยั้งกระบวนการหมักที่มีตัวแปรกำหนดกระบวนการ เช่น ความต้องการออกซิเจน อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ เป็นต้น ดังนั้นหากเราทำการควบคุมปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก เพื่อให้ในแต่ละระยะของการเจริญเติบโตให้ผลดีที่สุด เช่น ในระยะเจริญเติบโต (vegetative phase) ทำการควบคุมปัจจัยต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น แหล่งอาหาร แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น ให้มีความเหมาะสม เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้มากที่สุด และเมื่อถึงระยะการสร้างสปอร์ ทำการควบคุมปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโต ก็จะทำให้เซลล์ผลิตสปอร์และผลึกโปรตีนที่เป็นสารพิษออกมาได้มาก จากการควบคุมปัจจัยต่างๆใน 2 ระยะของการเจริญเติบโต ถ้าสามารถควบคุมให้สภาวะต่างๆของกระบวนการหมักเหมาะสมได้ จะได้ผลผลิตสูง ประสิทธิภาพในการผลิตที่ดี

ปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงการเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* โดยการให้ความเร็วรอบของการกวนใบพัด และ อัตราการให้อากาศแตกต่างกันระหว่างช่วงของการเจริญแบบ exponential และแบบการเติบโต stationary เพื่อศึกษาถึงผลของแรงเฉือนต่อการผลิตสาร thuringiensin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งสาร thuringiensin เป็นสารเมตาบอไลท์ ที่ทนความร้อนและละลายน้ำได้ ซึ่งจะถูกผลิตขึ้นในระหว่างช่วงของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* สาร thuringiensin เป็น exotoxin ชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลง ; Colorado potato beetles , และตัวหมัดหลายชนิดสาร thuringiensin เป็นผลิตภัณฑ์จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ mixed-growth associated ซึ่งจะเกิดในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* สภาวะในการเพาะเลี้ยงจะแตกต่างกันในช่วงการเจริญเติบโตของเซลล์ และ ช่วงการเกิดผลิตภัณฑ์ การเปลี่ยนอัตราการกวน และ อัตราการให้อากาศระหว่างช่วงการเจริญเติบโตของเซลล์แบบ exponential และแบบการเติบโต stationary ได้นำมาใช้เป็นตัวบ่งบอกถึงผลของแรงเฉือนที่เกิดจากการกวนต่อการเกิดผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเร็วรอบของการกวน ก่อให้เกิดผลกระทบต่อการผลิตสาร thuringiensin อย่างเห็นได้ชัดในระหว่างช่วงของการเจริญเติบโตของเซลล์แบบ stationary ผลดังกล่าวทำให้สามารถอธิบายได้ว่า เหตุใดจึงใช้ ถังหมักแบบหอคอย (tower reactor) เพราะถังหมักแบบดังกล่าว จะให้ปริมาณของแรงเฉือนในปริมาณน้อย จึงสามารถนำมาใช้เพื่อการผลิตให้ได้สาร thuringiensin ในปริมาณที่สูง

ประเทศไทยเริ่มนำเข้า *B. thuringiensis* มาจำหน่ายตั้งแต่ปี พ.ศ. 2515 แต่เริ่มใช้กันอย่างจริงจังในปี พ.ศ. 2521 จนกระทั่งปัจจุบันเกษตรกรหันมาใช้กันมากขึ้น เป็นสิ่งที่น่าสังเกตว่าปัจจุบันเชื้อ *B. thuringiensis* ที่ใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยมากนำเข้ามาจากต่างประเทศในปี พ.ศ. 2531 ปริมาณการนำเข้า 88 ตันสูงกว่าในปี พ.ศ. 2530 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ มูลค่าการนำเข้า 15.7 ล้านบาท แสดงให้เห็นว่าในแต่ละปีประเทศไทยต้องสูญเสียเงินตราเป็นจำนวนมากทำให้ต้นทุนการผลิตของเกษตรกรสูงขึ้นอีกด้วย ดังนั้นในปี พ.ศ. 2524 ประเทศไทยโดยนักวิจัยได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อดังกล่าว อันดับแรกทำการแยกเชื้อโดยเก็บตัวอย่างจากดินและมูลไหมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และยังได้ทำการสำรวจดินในภาคอื่นๆ เช่น ภาคกลาง ภาคใต้ เป็นต้น พบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ๆ หลายสายพันธุ์ จึงสามารถช่วยลดต้นทุนการนำเข้าจากต่างประเทศได้

นอกจากนี้แล้วปัญหาที่ว่าแมลงศัตรูพืชหลายชนิดสามารถสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงจากสารเคมีได้ เมื่อใช้เพียงชนิดเดียวติดต่อกันเป็นเวลานาน 2-3 ปี ทำให้มีการระบาดของแมลงศัตรูพืชเพิ่มขึ้น สร้างความเสียหายแก่พืชผลทางการเกษตรที่เกษตรกรปลูกไว้ ทำให้เกษตรกรจำเป็นต้องพ่นสารฆ่าแมลงจากสารเคมีมากขึ้นทั้งอัตราความเข้มข้นและจำนวนครั้งในการพ่นมากขึ้นเป็นเหตุให้สมดุลทางธรรมชาติเสียไปทำให้มีการเล็งเห็นถึงผลประโยชน์ และมีการนำสารกำจัดแมลงจาก *B. thuringiensis* มาใช้ในการเกษตรมากขึ้นโดย *B. thuringiensis* จะผลิตสารชีวินทรีย์กำจัดแมลงที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงชนิดหนึ่งเท่านั้น โดยที่แมลงที่มีอยู่ตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธรรมชาติที่ไม่ไปทำลายพืชจะไม่ได้รับอัตรายจากสารกำจัดแมลงศัตรูพืชจาก *B. thuringiensis* เป็นการลดต้นทุนในการซื้อสารเคมีซึ่งมีราคาแพงและยังเป็นอัตรายต่อทั้งผู้ใช้และแมลงต่างๆอีกด้วย

ในปัจจุบันประเทศไทยมีความต้องการสารกำจัดแมลงศัตรูพืชที่ผลิตได้จาก *B. thuringiensis* สูง ดังนั้นงานค้นคว้าวิจัยด้ารกระบวนการหมักเชื้อดังกล่าวทั้งในปัจจุบันและอนาคตจึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อปรับปรุงศักยภาพทางการผลิตและการควบคุมปัจจัยต่างๆ ในกระบวนการเพื่อให้ผลิตได้ผลผลิตที่สูงและมีประสิทธิภาพที่ดี

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ (น้ำเหลือใช้จากโรงงานผลิตผงชูรสที่ปรับสภาพแล้ว) ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนต่อการเติบโตของ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับฟลาสก์
2. เพื่อศึกษาสภาวะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในถังหมัก

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาการเติบโตของ *B. thuringiensis* JC590 ในแหล่งอาหารไนโตรเจน ซึ่งใช้น้ำอามิ-อามิ (น้ำเหลือใช้จากโรงงานผลิตผงชูรสที่มีผลต่อการปรับสภาพแล้ว) ในระดับฟลาสก์ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในถังหมักเพื่อศึกษาการเติบโตของเชื้อในถังหมัก

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน

ศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิที่ใช้เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* ที่ 2.5 5.0 10.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเติบโตของเชื้อ จากนั้นศึกษาถึงการเจริญของเชื้อ *B. thuringiensis* ในถังหมักเพื่อหาช่วงของการเติบโตและนำผลที่ได้มาใช้ในการศึกษาการแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในอาหารเพาะเลี้ยงที่ 2 ระดับในระยะของการเติบโตของเซลล์ช่วง stationary

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

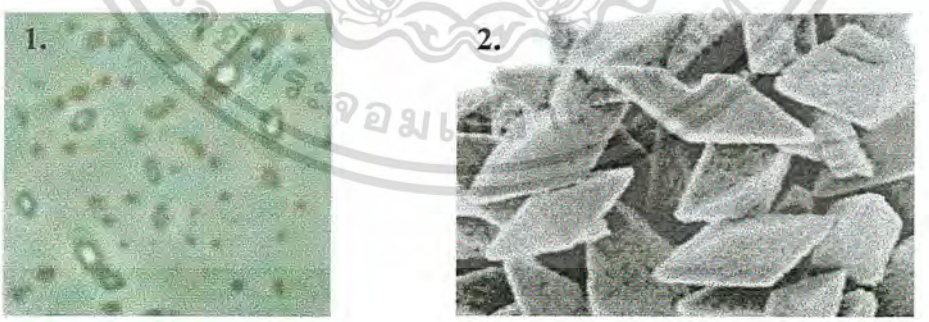
1. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* โดยใช้น้ำเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมผงชูรสมาเป็นส่วนประกอบหนึ่งของอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. ผลที่ได้จากการวิจัยจะนำไปใช้ในการปรับปรุงกระบวนการเพาะเลี้ยงให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *B. thuringiensis* เพื่อใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 คุณสมบัติต่างๆ และลักษณะโครงสร้าง (Burges และ Hussey, 1971)

Bacillus thuringiensis หรือ B.t. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) เป็น facultative anaerobic bacteris เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย รูปร่างเซลล์เป็นท่อนตรง (rod shape) ขนาด 0.7 x 3.5 μm เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลา (ทิพย์วดี, 2535) จำนวนแฟลกเจลลามีมากกว่า 1 มีความยาวเป็น 2-3 เท่าของขนาดเซลล์ แฟลกเจลลาของแบคทีเรียประกอบด้วยโปรตีนที่เรียกว่าแฟลกเจลลิน (flagellin) *B. thuringiensis* แต่ละสายพันธุ์จะมีแฟลกเจลลินแตกต่างกัน (อัจฉรา,ไม่ปรากฏปีพิมพ์) แบคทีเรียชนิดนี้สร้างสปอร์ภายในเซลล์ เรียกว่า เอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งอยู่ที่ปลายข้างหนึ่งของเซลล์ เอนโดสปอร์มีความทนทานต่อการทำลายโดยความร้อนได้ดีทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำภายในเอนโดสปอร์ ถ้ามีมากจะทนทานต่อความร้อนมากและมีผู้สันนิษฐานว่าปริมาณความสัมพันธ์ของกรดไดพิโคลินิก และ แคลเซียมไอออนมีความสำคัญต่อการทนทานต่อความร้อนด้วย (บัญญัติ, 2535; เจือจันทน์, 2530) ในขณะที่แบคทีเรียชนิดนี้สร้างสปอร์จะสร้างผลึกโปรตีนที่เรียกว่า parasporal body หรือ crystal protein อยู่ด้านหนึ่งของเซลล์ ส่วนใหญ่มีหนึ่งอันใน *B. thuringiensis* และส่วนใหญ่จะมีรูปร่างเหมือนปิรามิด 2 อัน ด้านฐานชนกัน (bipyramidal) แต่ในบางสายพันธุ์จะสร้าง crystal protein รูปกลมหรือเหลี่ยมซึ่งแล้วแต่ละสายพันธุ์



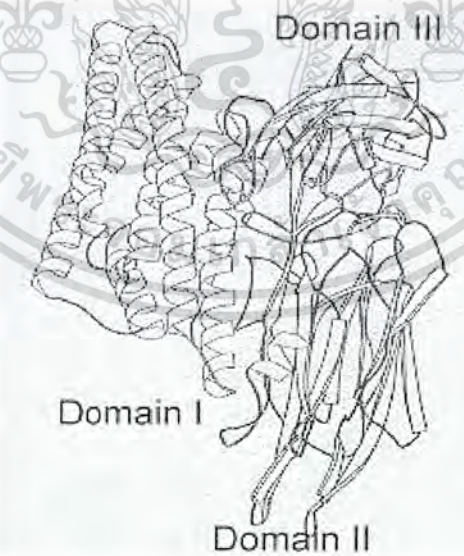
ภาพที่ 1 *B. thuringiensis* ที่ทำให้เกิดโรคในแมลง

1. ภาพถ่ายเซลล์ของเชื้อ *B. thuringiensis* ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast แสดงให้เห็นถึง vegetative cell ที่มี endospore อยู่ภายใน (ที่ส่องแสง) และ crystal protein (Poinar และ Thomas, 1978)
2. Electron Micrograph ของ ผลึก crystal protein (Bajwa และ Kogan , 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสร้างผลึกโปรตีนนี้เป็นลักษณะของ *B. thuringiensis* ทุกสายพันธุ์ เมื่อเลี้ยง *B. thuringiensis* ในอาหารเพาะเลี้ยง เชื้อจะเติบโตในระยะ vegetative growth อย่างรวดเร็ว เมื่อสิ้นสุดการเติบโตแบคทีเรียจะเริ่มสร้างสปอร์ภายในเซลล์ ในระยะเดียวกันปลายอีกข้างหนึ่งของเซลล์จะสร้างผลึกโปรตีน และสร้างเสร็จสมบูรณ์พร้อมๆกับการสร้างสปอร์ การสร้างผลึกโปรตีนนี้ไม่ใช่การตกผลึกของโปรตีนธรรมดาที่มีอยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ในระยะ vegetative growth แต่เป็นโปรตีนหน่วยย่อยที่แบคทีเรียสร้างขึ้นโดยเฉพาะเมื่อมารวมกันเป็นผลึกโปรตีนและจะสร้างเฉพาะตอนที่สร้างสปอร์หากใส่สารยับยั้งการสร้างสปอร์ก็จะไม่สร้างผลึกโปรตีนในเซลล์เช่นกัน

ผลึกโปรตีน หรือ crystal protein ประกอบด้วยโมเลกุลของโปรตีนที่มีรูปร่างเป็นแบบ dumb-bell shape ขนาดยาวประมาณ 15 μm และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 μm น้ำหนักโมเลกุล 230,000 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด ไม่ทนต่อความร้อน ไม่ละลายน้ำและสารละลายอินทรีย์อื่นๆ แต่จะละลายในด่าง ทนอยู่ในน้ำหรือสภาพแห้งแล้งได้นาน เช่น ในที่มืดและที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียสจะทนได้นานถึง 10 ปี ผลึกโปรตีนเป็น protoxin ที่เรียกว่า heat-labile protoxin เมื่อเข้าไปในตัวแมลงจะถูกน้ำย่อย proteolytic enzyme ในกระเพาะอาหารของแมลงย่อยสลายเป็นโปรตีนโมเลกุลย่อยๆ ซึ่งเป็นพิษต่อแมลง ผลึกโปรตีนจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้แมลงได้รับเชื้อแบคทีเรียนี้ตาย เมื่อทำการศึกษาโครงสร้างโดยใช้ X-ray Crystallography โดยศึกษาโครงสร้างของผลึกโปรตีน CryIIIA (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 รูปร่างของโครงสร้าง 3 มิติ ของผลึกโปรตีน CryIIA. I II และ III ที่ถ่ายโดยใช้ X-ray Crystallography ที่มา : Carroll และ คณะ (1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

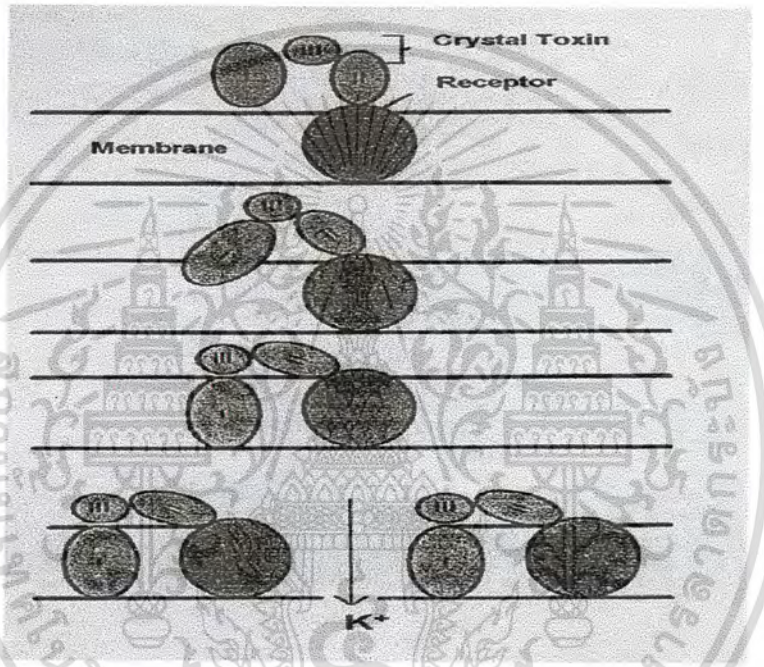
จากภาพที่ 2 จะเห็นว่ามี 3 Domain ด้วยกัน ซึ่งมีหน้าที่ต่างๆกันคือ

Domain I มี 5 เกลียวมีหน้าที่ทำให้เกิดรูในผนังกระเพาะอาหารของแมลง (pore formation)

Domain II ทำหน้าที่เป็น receptor binding กับกระเพาะอาหารของแมลง

Domain III เป็นตัวรักษาความคงทนของ toxin stability

ลักษณะการทำหน้าที่ของ Domain ทั้ง 3 มีความสัมพันธ์กันในการเข้าทำปฏิกิริยากับกระเพาะอาหาร (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แบบจำลองการทำให้เกิดช่องว่างภายในเยื่อหุ้มเซลล์กระเพาะอาหาร โดย crystal protein

ที่มา : Yamamoto และ Powell (1993)

ผลึกสารพิษที่สร้างโดย *B. thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆมีรูปร่าง 5 แบบ คือ

1. ผลึกรูป bipyramid
2. ผลึกรูป amorphous
3. ผลึกรูป cuboidal
4. ผลึกรูป flat-shape
5. ผลึกรูป bipyramid และ spherical

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การจัดจำแนกยีนที่สร้าง crystal protein (Cry genes)

ในปี 1989 Hofte และ Whiteley ได้วิจัยพบแบบแผนสำหรับ Cry genes ซึ่งในขณะนั้นมี 40 genes ที่ถูก cloned และศึกษาลักษณะของ genes โดยแบ่ง genes ออกเป็น 4 กลุ่ม การจัดกลุ่มยึดความจำเพาะต่อแมลง และดูความคล้ายกันของลำดับเบสของ nucleotide ดังนี้

genes แบบที่ 1 สามารถถอดรหัสแล้วได้โปรตีนขนาด 130 กิโลดาลตัน ซึ่งโดยปกติจะมีผลเฉพาะกับแมลงในอันดับ Lepidoptera

genes แบบที่ 2 สามารถถอดรหัสแล้วได้โปรตีนที่มีขนาด 70 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีผลต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera เป็นหลัก แล้วยังมีผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก gene หรือ Cry IIA ซึ่งมีผลต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera และdiptera

genes แบบที่ 3 สามารถถอดรหัสได้โปรตีนที่มีขนาด 70 กิโลดาลตัน และโปรตีนนี้จะมีผลต่อแมลงในอันดับ Coleoptera

genes แบบที่ 4 จะให้โปรตีนที่มีขนาด 130 กิโลดาลตัน และ 70 กิโลดาลตัน ซึ่งโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ถูกแยกได้ จาก *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* โดยจะมีผลต่อตัวอ่อนของยุง และริ้นดำ (mosquitos and blackfly) ในแมลงอันดับ Diptera สูง (ตารางที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 การจำแนกของ *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes

Gene	Crystal	size[a] (kDa)	Acces number[b]
Type I			
CryIA(a)	Bipyramid	113	M11250
CryIA(b)	Bipyramid	131	M13898
CryIA(c)	Bipyramid	133	M11068
CryIB	Bipyramid	138	X06711
CryIC	Bipyramid	135	X07518
CryID	Bipyramid	133	X54160
CryIE	Bipyramid	133	X53985
CryIF	Bipyramid	134	X63897
CryIG	Bipyramid	130	X58120
Type II			
CryIIA	Cuboid	71	M31738
CryIIB	?	71	M23723
CryIIC	Cuboid	69	X57252
Type III			
CryIIIA	Flatsquare	73	M22472
CryIIIB	Irregular	74	X17123
CryIIIB(b)[c]	Irregular	74	M89794
Type IV			
CryIVA	Bipyramid	134	Y00423
CryIVB	Bipyramid	128	X07423
CryIVC	?	78	M12662
CryIVD	Round	72	M31737
CrytA	Irregular	27	XX03182

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Gene	Crystal	size[a] (kDa)	Acces number[b]
Not classified			
CryX1(IIIC)	Bipyramid	129	M64478
CryX2(IIID)	Square	73	X59797
CryX3	Cuboid	35	-
CryX4	Cuboid	38	-

หมายเหตุ [a] Protein size deduced from the nucleotide sequence.

[b] Genbank (v.70) EMBL (v.29) accession number for the holotype sequence.

[c] May be designated cryIIIB2.

? ยังไม่สามารถสรุปได้ ที่มา : Yamamoto และ Powell (1993)

การแบ่งผลึกของสารพิษตามลักษณะที่ทำให้เกิดโรคกับแมลงได้ 4 ชนิด คือ

1. ทำให้เกิดโรคกับแมลงในอันดับ Lepidoptera
2. ทำให้เกิดโรคกับแมลงในอันดับ Lepidoptera และ Diptera
3. ทำให้เกิดโรคกับแมลงในอันดับ Coleoptera
4. ทำให้เกิดโรคกับแมลงในอันดับ Diptera

2.3 การจำแนกเชื้อ *B. thuringiensis* (Barjac และ Frachon, 1990)

2.3.1 ดูจากคุณลักษณะและโครงสร้างของเซลล์รวมทั้ง

1. การตอบสนองทางด้านชีวเคมี (Biochemical Response)
2. ลักษณะทาง Serology (Flagellar Antigens)
3. ลักษณะโครงสร้างของโมเลกุล (Molecular Biology)

B. thuringiensis เมื่อนำมาเลี้ยงบนจานเลี้ยงเชื้อจะมีโคโลนี (colony) สีขาวขุ่น ผิวไม่มัน โคโลนีค่อนข้างใหญ่ (5-10 mm) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod-shape) *B. thuringiensis* สามารถสร้างสปอร์ถ้าสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม สปอร์สามารถมีชีวิตอยู่ได้ทนทานต่อความแห้งแล้ง เมื่อใดที่มีอาหารอุดมสมบูรณ์ สปอร์จะงอกเจริญเติบโตแพร่พันธุ์ต่อไป ผนังเซลล์ของ *B. thuringiensis* จะเป็นแกรมบวก (positive gram) รอบๆเซลล์จะมีแส้ หรือ flagellar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งใช้ในการเคลื่อนไหวจำนวนแส้มีมากกว่า 1 มีความยาวเป็น 2 ถึง 3 เท่าของขนาดของเซลล์ ในปี 1981 นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศษ Dr. de Barjac Dr. Bonnefoli ได้เสนอวิธีการจำแนกทาง serology โดยอาศัยคุณลักษณะของ H-antigen (flagella) แบ่ง *B. thuringiensis* ออกเป็น subspecies หรือ varieties ในปัจจุบันเชื้อ *B. thuringiensis* มีอยู่ 27 subspecies (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การจำแนกทาง serology โดยอาศัยคุณลักษณะของ H-antigen ในการแบ่ง *B. thuringiensis* ออกเป็น subspecies

H-antigen	subspecies
1	*thuringiensis*
2	*finitimus*
3a : 3b : 3c	*kurstaki*
3a : 3c	*alesti*
3a : 3d	*sumiyoshiensis*
3a : 3d : 3e	*fukuokaensis*
4a : 4b	*sotto*
4a : 4c	*kenyae*
5a : 5b	*galleriae*
5a : 5c	*canadensis*
6a : 6b	*entomocidus*
6a : 6c	*oyamansis*
7	*aizawai*
8a :8b	*morrisoni*
8a : 8c	*ostriniae*
8a : 8d	*nigeriensis*
9	*tolworthi*
10	*darmstadiensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 (ต่อ)

H-antigen	subspecies
11a :11b	*toumanoffi*
11a : 11c	*kyushuensis*
12	*thompsoni*
13	*pakistani*
14	*israelensis*
15	*dakota*
16	*indiana*
17	*tohokhuensis*
18	*kumamotoensis*
19	*tochigiensis*
20a : 20b	*yunnanensis*
20a : 20c	*pondicheriensis*
21	*colmeri*
22	*shandongiensis*
23	*japonensis*
24	*neoleonensis*
25	*coreanensis*
26	*silo*
27	*mexicanensis*

ที่มา : Barjac (1981)

2.4 สารพิษที่สร้างโดย *B. thuringiensis* (Burges และ Hussey,1971)

B. thuringiensis สร้างสารพิษหลายชนิด เชื้อต่างสายพันธุ์สร้างสารพิษที่มีคุณสมบัติเฉพาะเจาะจงกับแมลงต่างชนิดกันไปและมีความเป็นพิษมากน้อยแตกต่างกันไป สารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นมีอยู่ 5 ชนิด

2.4.1 Delta (δ) endotoxin พบครั้งแรกโดย Hannay เมื่อปี ค.ศ.1953 ในหนอนไหม เรียกว่า crystal protein หรือ parasporal body นอกจากนี้ยังพบใน *B. subtillis B. laterosporus B. popilliae*

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ *Clostridium cochiearium* แต่มีสารพิษต่อแมลงมากน้อยแตกต่างกันไป จนถึงปัจจุบันพบว่ามีผลเฉพาะกับหนอนผีเสื้อบางชนิด ยุง ริ้น และ blackflies เท่านั้น

2.4.2 Beta (β) exotoxin หรือ thuringiensin หรือ thermostable exotoxin คือ สารพิษที่ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ขณะที่เซลล์กำลังเจริญเติบโต บางทีเรียกว่า fly factor เพราะพบครั้งแรกในแมลงวันบ้านที่ตายเพราะ *B. thuringiensis* เมื่อศึกษาดูพบว่าแมลงวันไม่ได้ตายเพราะ δ-endotoxin แต่กลับเป็นสารพิษอีกชนิดหนึ่งซึ่งทนความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 15 นาที สารพิษนี้สร้างก่อนการสร้างสปอร์ โดยจะสร้างขึ้นระหว่าง vegetative growth phase เป็นสารประกอบพวก nucleotide น้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นสารที่ละลายในน้ำได้ เป็นอันตรายต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera Diptera Hymenoptera (รวมถึงผึ้งด้วย) Isoptera Orthoptera Hemiptera Neuroptera และ Coleoptera แมลงที่กินสารพิษชนิดนี้เข้าไปจะทำให้รูปร่างเปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนแปลงจะเห็นได้ในทุกระยะ เช่น ตัวอ่อนอาจไม่เข้าดักแด้ ถ้าเป็นดักแด้จะมีรูปร่างบิดเบี้ยว และถ้าเป็นตัวเต็มวัยก็จะไม่สมบูรณ์ ปีกแมลงจะคุด หรือ แขน ขา หนวดแมลงจะหายไป วงจรชีวิตจะสั้นลงและไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ โดยสารพิษชนิดนี้จะไปมีผลต่อระบบฮอร์โมน กระบวนการเมทาบอลิซึม และการสร้างเอนไซม์ต่างๆ exotoxin ชนิดนี้มีพิษต่อแมลงหลายชนิดมากกว่า endotoxin

การใช้ β-exotoxin ต่อผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่พบว่าสามารถทำให้เกิดความผิดปกติกับผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่ได้ทุกระยะตั้งแต่ระยะหนอน ดักแด้ และเมื่อหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัยจะมีรูปร่างผิดปกติ เช่น ปีกยับไม่สามารถบินได้ ปากมีลักษณะผิดปกติรวมถึงขนาดของลำตัวสั้นลง ส่วนต่างๆของลำตัวบวมขึ้น จากการรวบรวมข้อมูลพบว่า exotoxin จะทำให้ส่วนของปากและปีกของแมลงผิดปกติด้วย

2.4.3 Alpha (α) exotoxin หรือ lecithinase C หรือ phospholipaseC เป็นสารซึ่งสร้างในเซลล์และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ พบโดย Toumanoff จึงเรียกว่า Toumanoff's factor นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกอื่นๆ อีกเช่น mouse factor ,thermosensitive exotoxin เป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อน ละลายในน้ำได้ มีคุณสมบัติพิเศษเป็น hemolysin คือทำลายเซลล์เม็ดเลือด และมีผลต่อการขัดขวางการทำงานในระบบสรีรวิทยาหลายอย่างในตัวแมลง

2.4.4 Gamma (γ) exotoxin เป็นสารพิษที่ไม่ทนต่อความร้อน อ่อนแอต่ออากาศก๊าซออกซิเจน และ แสงอาทิตย์ ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส จะถูกทำลายภายใน 10-15 นาที กลไกในการนำเข้าทำลายแมลงนี้ยังไม่เป็นที่รู้กันแน่ชัด

2.4.5 Louse factor พบโดย Gingrich มีเหาถึง 4 ชนิด แสดงอาการผิดปกติเมื่อได้รับเชื้อ *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) เชื้อที่ไม่สร้าง exotoxin และพบว่าอาการผิดปกติไม่ได้เกิดจาก endotoxin จึงรายงานว่าเป็นสารพิษอีกชนิดหนึ่งที่เชื้อสร้างขึ้นและให้ชื่อสารนี้ว่า

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

louse factor และยังมีเอนไซม์ (exoenzymes) พวก chitinase เป็นตัวช่วยส่งเสริมให้การเข้าทำลายดีขึ้น (อัจฉรา, ไม่ปรากฏปีพิมพ์)

2.5 กลไกการทำให้เกิดโรคของ *B. thuringiensis* (Burges และ Hussey, 1971)

B. thuringiensis นั้นทำให้เกิดโรคกับแมลงหลายชนิด โดยเฉพาะกับหนอนผีเสื้อ ซึ่งพบว่ามีหนอนผีเสื้อประมาณ 150 ชนิดที่อ่อนแอต่อ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบเนื่องจากมีผลต่อแมลงหลายชนิดอาการและการตอบสนองของแมลงต่อเชื้อจึงมีหลายแบบความอ่อนแอของแมลงต่อเชื้อ *B. thuringiensis* นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของแมลง นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆด้วย เช่น อายุของแมลง ความแข็งแรงของแมลง และสภาพแวดล้อมต่างๆ ส่วนความเป็นพิษของเชื้อแบคทีเรียนั้นขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์ของเชื้อ อายุของเชื้อ สภาพการเพาะเลี้ยง และ อัตราส่วนระหว่างสปอร์กับผลึกโปรตีนที่แมลงได้รับเข้าไป แมลงจะเป็นโรค โดยการกินเชื้อเข้าไป (ทิพย์วดี, 2535) *B. thuringiensis* มีกลไกในการทำลายแมลง 2 ประการหลัก คือ

2.5.1 ทำให้เกิดอัมพาตทั่วตัว (general paralysis) จากการศึกษาจากตัวอย่างหนอนไหมที่ได้รับ *B. thuringiensis* พบว่าแมลงจะเป็นอัมพาตอย่างรวดเร็วจนกระทั่งหยุดนิ่งเฉยไม่ทำอะไรเลยภายใน 80 นาที หลังจากได้รับเชื้อ การเกิดอัมพาตจะเกิดควบคู่กับการเกิดสภาพความเป็นด่างในเลือด ซึ่งเกิดจากที่ crystal protein หรือ endotoxin ไปทำลายผนังกระเพาะอาหาร ทำให้เกิดการซึมผ่านเข้าออกของสารในกระเพาะอาหารและเลือด สมดุลที่มีอยู่ในธรรมชาติถูกเปลี่ยนไปสภาพพีเอชในกระเพาะอาหารปกติประมาณ 10.2-10.5 จะต่ำลง และในเลือดซึ่งปกติจะมี พีเอชประมาณ 6.8 ก็จะเพิ่มมากขึ้น การเพิ่มขึ้นของพีเอชในเลือดทำให้แมลงเกิดอาการเป็นอัมพาตและจะเป็นไปทั่วตัวอย่างรวดเร็วและรุนแรง

2.5.2 ทำให้เกิดอัมพาตที่กระเพาะอาหาร (gut paralysis) ในแมลงบางชนิดจะไม่เกิดอัมพาตทั่วตัว และตรวจพบว่าพีเอชในเลือดไม่ได้เปลี่ยนแปลง แต่กระเพาะอาหารของแมลงจะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ทำให้แมลงหยุดกินอาหาร อาเจียนและท้องเสีย แมลงจะตายภายใน 24-48 ชั่วโมง

องค์ประกอบที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงได้ดีที่สุดของ *B. thuringiensis* คือ δ-endotoxin อย่างไรก็ตามแมลงบางชนิดไม่อ่อนแอต่อ endotoxin นี้แต่กลับอ่อนแอต่อ exotoxin ชนิดอื่นที่ *B. thuringiensis* สร้างขึ้นเช่น Thermostable exotoxin ซึ่งทำให้แมลงตายได้อย่างรวดเร็วเช่นเดียวกันด้วยอาการที่เรียกว่า toxemia สารพิษแต่ละชนิดมีกลไกในการเข้าทำลายแมลงต่างๆกัน ในแมลงบางชนิดสารพิษที่ *B. thuringiensis* สร้างขึ้นก็ไม่เป็นอันตรายต่อแมลง แต่ *B. thuringiensis* ที่แมลงกินเข้าไปผ่านผนังกระเพาะอาหารเข้าไปในเลือดและเจริญเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วจนทั่วตัวแมลง แมลงจะตายด้วยอาการที่เรียกว่า septicemia *B. thuringiensis* บางชนิดก็สามารถทำลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมลงด้วยกลไกหลายๆอย่างนี้รวมกัน เช่นนอกจากทำให้เป็นอัมพาตแล้ว *B. thuringiensis* ยังเข้าไปเพิ่มปริมาณในเลือดด้วยเป็นต้น

ลักษณะโดยทั่วไปของแมลงภายหลังที่ได้รับเชื้อ *B. thuringiensis* จะมีการเคลื่อนไหวที่ช้าลง หยุดเคลื่อนไหวไม่อยากกินอาหาร สำรอกอาหารออกมา และมีอาการเป็นพิษในทางเดินอาหาร โดย *B. thuringiensis* จะเข้าไปในช่องว่างในลำตัวแมลง ทั้งนี้อาจผ่านเข้าทางแผลที่บริเวณลำตัว หรือแผลที่กระเพาะอาหาร ในระหว่างการลอกคราบ อาจผ่านจากเซลล์กระเพาะอาหารเข้าไปในเลือด เนื่องจากผนังรอบท่ออาหาร (peritrophic membrane) ซึ่งเป็นด่านกั้นอยู่หลุดไปพร้อมกับการลอกคราบ *B. thuringiensis* จะทวีเพิ่มจำนวนในช่องว่างภายในลำตัวของแมลง หรือในเลือดแมลง เกิดการทำลายอวัยวะต่างๆ *B. thuringiensis* บางชนิดจะสร้างสารพิษ (toxin) ซึ่งมีผลทางตรงหรือ ทางอ้อมต่อการย่อยอาหารในแมลง เมื่อแมลงตายแล้วจะมีสีเข้มขึ้นเป็นสีน้ำตาลและดำ ตัวอ่อนนุ่มรูปร่างไม่คงที่ อวัยวะภายในเหลว และมีกลิ่นเหม็น

อาการของแมลงภายหลังที่ได้รับเชื้อ *B. thuringiensis* มักทำให้การย่อยอาหาร การหายใจ และ การหมุนเวียนโลหิตของแมลงผิดปกติไปจากเดิม การเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ เกือบทุกชนิดในแมลง เช่น *B. thuringiensis* ที่เข้าทำลายชั้น epithelial cells ของท่ออาหารของแมลง จะทำให้เซลล์บวมโต และ แตก แม้ว่าเซลล์ชั้นนี้จะลอกหลุดไปพร้อมกับการลอกคราบ และ แมลงสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาแทน *B. thuringiensis* ที่ออกมาจากเซลล์เก่าที่ตายแล้ว จะเข้าทำลายเซลล์ใหม่ทันทีในเวลาอันรวดเร็ว

B. thuringiensis อาจมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของกระเพาะอาหารของแมลง ทำให้แมลงย่อยอาหารไม่เต็มที่ แมลงอาจตายเพราะการขาดสารอาหารมิใช่จากสารพิษหรือการทวีจำนวนของเชื้อ *B. thuringiensis* นอกจากนี้ความผิดปกติอันเนื่องมาจากเอนไซม์ซึ่ง *B. thuringiensis* สร้างขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโต เช่น *B. thuringiensis* สร้างเอนไซม์ exoenzyme lecithinase ในระหว่างที่เซลล์แบคทีเรียทวีจำนวนมากขึ้น เอนไซม์นี้จะทำลายนิวเคลียสของ epithelial cells ทำให้เซลล์ชั้นนี้แตกสลาย เปิดโอกาสให้เชื้อแบคทีเรียเข้าไปในช่องว่างในตัวแมลงทวีจำนวนในเลือดและทำให้เกิดสภาวะเลือดเป็นกรด (septicemia) เมื่อเซลล์ผนังรอบท่ออาหารของแมลงถูกทำลาย ทำให้พีเอชของสารในกระเพาะอาหาร และ พีเอชของเลือดเสียสมดุลย์ เลือดของแมลงมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ต่ำมาก ดังนั้น พีเอชในเลือดเพิ่มเพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้เกิดอาการอัมพาตได้ การสูญเสียน้ำในเลือดเป็นอีกลักษณะหนึ่งที่พบในแมลงที่เป็นโรคจากเชื้อ *B. thuringiensis* และเมื่อเป็นโรคมากๆเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ เกิดการแห้งไปด้วย การสูญเสียน้ำอย่างมากมายนี้เกิดจากความผิดปกติของระบบขับถ่ายของเสีย และอาจรุนแรงจนทำให้แมลงตายเพราะการขาดน้ำได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การจัดการศัตรูพืชในปัจจุบัน (สุรัตน์ และคณะ, 2542)

ในสภาพการณ์ปัจจุบัน หลายประเทศมีการใช้มาตรการและกฎระเบียบต่างๆด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชมาใช้กับสินค้าเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีการเข้มงวดเรื่องสารเจือปนและสารพิษตกค้างในผลผลิตการเกษตร ซึ่งเป็นอุปสรรคสำคัญในการส่งออกสินค้าเกษตรของประเทศไทย กรมวิชาการเกษตรได้เล็งเห็นความสำคัญของปัญหานี้ ในปี พ.ศ.2542 กรมวิชาการเกษตรได้กำหนดให้เป็นปีแห่งการรณรงค์ "การผลิตทางการเกษตรอย่างถูกต้องและเหมาะสม" หรือ "1999, The year of Good Agricultural Practice (GAP)" โดยขบวนการผลิตทางการเกษตรทุกขั้นตอนจะต้องมีการปฏิบัติอย่างถูกต้องและเหมาะสมตามหลักทางวิชาการ

ในด้านการอารักขาพืชหรือการป้องกันกำจัดศัตรูพืช การจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน (IPM) นับว่ามีบทบาทสำคัญยิ่งในการผลิตทางการเกษตรอย่างถูกต้องและเหมาะสม เพราะ IPM สามารถลดปัญหาการใช้สารเคมีมากเกินความจำเป็น ซึ่งก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในผลผลิตเกษตร พืชที่กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กำหนดให้เป็น "product champion" คือ ทุเรียน ลำไย กล้วยไม้ โดยกรมวิชาการเกษตรได้รับมอบหมายจากกระทรวงเกษตรฯให้เป็นผู้ดูแลรับผิดชอบพืชดังกล่าว กรมวิชาการเกษตรโดยกองกีฏและสัตววิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช และหน่วยงานที่รับผิดชอบด้านอารักขาพืช ได้นำผลการค้นคว้าทดลองต้น ๆ มากำหนดเป็นเทคโนโลยีในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ทั้งในด้านแมลง โรค และวัชพืช โดยยึดหลักการของ IPM เป็นแนวทางในการจัดการปัญหาศัตรูพืชเหล่านั้น ทั้งนี้โดยวัตถุประสงค์หลักคือ ลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อให้ผลผลิตของพืชดังกล่าวปลอดภัยจากสารพิษตกค้าง

นอกจากนี้ ในปัจจุบัน กรมวิชาการเกษตรยังมีโครงการวิจัยลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรในการผลิตพืชต่าง ๆ คือ ข้าว พืชตระกูลกะหล่ำ คะน้า พริก หน่อไม้ฝรั่ง ส้มเขียวหวาน ทุเรียน ข้าวโพดหวาน อ้อย ปาล์มน้ำมัน ยางพารา เป็นต้น โดยมอบหมายให้กองวิจัยด้านอารักขาพืช และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องร่วมกับในโครงการดังกล่าว เน้นเรื่องการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานเป็นสำคัญ โดยนำเอาผลงานวิจัยด้านต่างๆที่ได้ผลดีมาปรับใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพซึ่งโครงการนี้กำลังดำเนินการอยู่

อนึ่ง ในพืชอื่น ๆ เช่น ฝ้าย มะเขือเทศ ลำไย ลิ้นจี่ มะม่วง กล้วยไม้ มะลิ องุ่น หอมหัวใหญ่ สตรอเบอรี่ กระเจี๊ยบเขียว ถั่วเหลือง ผักสด สับปะรด ฯลฯ พืชเหล่านี้ก็ยังมีงานวิจัยการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสารด้วยเช่นกัน โดยมีเป้าหมายลดการใช้สารเคมีในการปราบศัตรูพืช กล่าวได้ว่า การจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานมีความสำคัญยิ่งในปัจจุบัน งานวิจัยหรือโครงการใด ๆ ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรหรือการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม จะต้องเน้นเรื่องการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานเป็นประการสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 การจัดการศัตรูพืชในอนาคต (สุรัตน์ และคณะ, 2542)

จากปัญหามลพิษในสภาพแวดล้อมซึ่งนับวันจะทวีความรุนแรงยิ่งขึ้นจนเป็นที่วิตกกันทั่วไปทั่วโลกต่างตระหนักถึงปัญหานี้และมีการรณรงค์ให้ช่วยกันรักษาสภาพแวดล้อมให้ปราศจากมลพิษในด้านการเกษตรโดยเฉพาะการอารักขาพืชซึ่งมีการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชกันอย่างกว้างขวาง ก่อให้เกิดอันตรายและความเสียหายทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสภาพแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตทั้งหลายทั้งปวง

ในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ.2540-2544) ได้เน้นเรื่องการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมและการพัฒนาอย่างยั่งยืน ซึ่งในกรอบนโยบายและแนวทางการดำเนินงานของกรมวิชาการเกษตรในแผนพัฒนาฯ ฉบับที่ 8 เน้นเรื่องการลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร การวิจัยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ไส้เดือนฝอย แมลงศัตรูธรรมชาติ และสารสกัดจากพืชมาทดแทนการใช้สารเคมี และ นำไปสู่การป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบผสมผสาน ร่วมกับการป้องกันกำจัดศัตรูพืชวิธีอื่นๆ เพื่อลดการใช้สารเคมีลดมลภาวะในสภาพแวดล้อม และเพิ่มความปลอดภัยจากการใช้สารเคมีทางการเกษตร

กรมวิชาการเกษตรได้กำหนดมาตรการในการวิจัยและพัฒนาการลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร เพื่อลดมลภาวะในธรรมชาติทำให้คุณภาพชีวิตดีขึ้น และเกิดความยั่งยืนในสภาพแวดล้อม กลยุทธในการดำเนินงานคือ

วิจัยและพัฒนาการนำวิธีทางชีวภาพมาใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ทำให้เกิดความยั่งยืนในสภาพแวดล้อมทางการเกษตร วิจัยและพัฒนาการป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบผสมผสาน เพื่อลดการใช้สารเคมี ลดมลภาวะในสภาพแวดล้อม วิจัยและพัฒนา พืช วัชพืช โรค แมลง สัตว์ รวมทั้งจุลินทรีย์ ที่เป็นประโยชน์ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อโปรโตซัว และไส้เดือนฝอย จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่จะนำใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืช ทดแทนสารเคมีที่ยังใช้กันมากในปัจจุบัน โดยนำมาใช้ร่วมกับวิธีการอื่น เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ในอนาคตเชื่อแน่ว่าสารชีวินทรีย์เหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชมากยิ่งขึ้นไป

อนึ่ง เชื้อแบคทีเรีย หรือ Bt นับว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจกันมาก และมีการใช้กันมากยิ่งขึ้น อีกทั้งมีการพัฒนาใช้เชื้อ Bt ในการสร้างพืชจำลองพันธุ์ต้านทานแมลง กล่าวคือมีการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติต้านทานแมลงบางชนิด โดยการเสริมแต่ง Bt gene แทรกเข้าไปในโครโมโซมของพืช ทำให้พืชสามารถสร้างโปรตีนสารพิษที่เป็นอันตรายต่อแมลงศัตรู ยีนนี้ยังสามารถถ่ายทอดไปยังพืชรุ่นต่อไปได้ ซึ่งคุณลักษณะเช่นนี้ไม่สามารถทำได้ด้วยวิธีผสมพันธุ์พืชแบบปกติ ที่กำลังกล่าวขวัญกันมากปัจจุบันคือ ฝ้าย Bt อย่างไรก็ตาม การพัฒนาใช้พืชจำลองพันธุ์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

มี Bt gene ก็มีข้อควรคำนึงถึงหรือพึงระมัดระวังอยู่ 2 ประการ คือ การสร้างความต้านทานในแมลงต่อพืชจำลองพันธุ์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ และความปลอดภัยทางชีวภาพ เช่น อาจทำลายแมลงที่เป็นประโยชน์ที่ได้รับโปรตีนสารพิษ เป็นต้น จึงเป็นเรื่องที่ทุกฝ่ายจะต้องตระหนักถึงสิ่งเหล่านี้ และทำการศึกษาให้ทราบถึงผลเสียเหล่านี้ และทำการศึกษาให้ทราบถึงผลเสียเหล่านี้ให้ชัดเจน ก่อนที่จะส่งเสริมและเผยแพร่สู่เกษตร

2.8 การป้องกันกำจัดแมลง โดยไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

ในการควบคุมปริมาณแมลงที่มีโทษ การปลูกพืชหมุนเวียนในลักษณะไร่นาสวนผสม เพื่อเป็นการเปลี่ยนพืชอาหารหรือทำให้พืชอาหารของแมลงมีจำกัดในบางช่วงของปี จะทำให้ปริมาณแมลงศัตรูลดลงได้ในระดับหนึ่ง ส่วนการหามาตรการในการควบคุมหรือจำกัดปัจจัยอื่นข้างต้น ในทางปฏิบัติเป็นไปได้ค่อนข้างยาก

ปัจจุบันนักกีฏวิทยาได้เริ่มนำวิธีการในการกำจัดแมลงแผนใหม่ โดยไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม หรือมีก็น้อยที่สุด ซึ่งเรียกว่า การควบคุมแมลงโดยชีววิธี (biological control) และการผสมผสานการจัดการแมลงศัตรูในลักษณะ รวมวิธีการหลายๆ อย่างเข้าด้วยกัน (integrated pest management) เช่น การใช้วิธีควบคุมแมลง โดยชีววิธีร่วมกับการใช้สารฆ่าแมลงที่มีพิษตกค้างในระยะสั้น เป็นต้น

หลักการในการควบคุมแมลงโดยชีววิธี คือการกำจัดแมลงโดยใช้ศัตรูธรรมชาติ ของแมลงเหล่านั้นเป็นตัวจัดการ ได้แก่ศัตรูธรรมชาติซึ่งมักเป็นแมลงอีกชนิดหนึ่งนั่นเอง เช่น ด้วงเต่าลาย มวนเพชรฆาต ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มพวกแมลงตัวห้ำ (entomophagous insects หรือ predators) ซึ่งกินแมลงอื่นเป็นอาหาร หรือแมลงตัวเบียน (parasitoids) ที่มักทำลายเหยื่อในระยะตัวอ่อน เช่น แตนเบียน ต่อเบียน หรืออาจเป็น จุลินทรีย์ซึ่งเป็นโรคระบาด (pathogens) เช่น เชื้อไวรัส แบคทีเรีย รา หรือไส้เดือนฝอย ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคที่พบเฉพาะภายในกลุ่มของแมลงชนิดนั้นๆ วิธีการดังกล่าวนี้เคยใช้ได้ผล ในการปราบแมลงศัตรูหลายชนิดมาแล้ว จึงเป็นที่เชื่อถือได้ว่า แมลงหรือเชื้อโรคที่เรานำไปปล่อยนั้น จะเป็นกลไกช่วยในการปราบแมลงศัตรูได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง และไม่มีพิษตกค้างในธรรมชาติ เช่นสารฆ่าแมลงทั่วไปอย่างแน่นอน

2.9 ผลตอบสนองของประชาชนต่อการฉีดพ่นสารชีวภาพ

ประชาชนที่อาศัยอยู่บริเวณป่าไม้ หรือฟาร์มจะได้รับสารจากการฉีดพ่นทางอากาศโดยอาศัยเฮลิคอปเตอร์ ความเข้าใจหรือพฤติกรรมในการตอบสนองของประชาชนจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสถานที่ที่ประชาชนอาศัยอยู่ ในเขตชนบทประชาชนบางพวกอาจมีความเข้าใจเกี่ยวกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

47311

การฉีดพ่นทางอากาศบ้าง เนื่องจากมีความคุ้นเคยกับการฉีดพ่นสารฆ่าแมลงอยู่แล้ว แต่ก็อาจจะมีบางพวกที่ยังมีความกังวลเกี่ยวกับความปลอดภัยจากการฉีดพ่นสารฆ่าแมลง จึงต้องมีการให้ความรู้เกี่ยวกับสารฆ่าแมลงทางชีวภาพนี้ให้มากขึ้นโดยต้องบอกถึงคุณโทษ ข้อดีและข้อเสีย กับประชาชนให้มากขึ้นเพื่อให้ประชาชนมีความเข้าใจที่ตรงกันและนำไปสู่การใช้สารฆ่าแมลงทางชีวภาพในการปราบศัตรูพืชกันมากขึ้น

2.10 การวิจัยและคัดเลือกสายพันธุ์ *B. thuringiensis* (อัจฉรา,2535)

การที่จะใช้เชื้อ *B. thuringiensis* ควบคุมแมลงศัตรูพืชให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับการคัดเลือกสายพันธุ์ (strain selection) ความล้มเหลวที่เกิดจากการใช้เชื้อแบคทีเรียในการควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดหนึ่งไม่ได้หมายความว่าเชื้อ *B. thuringiensis* จะมีประสิทธิภาพไม่ดี หรือ แมลงศัตรูพืชชนิดนั้นใช้เชื้อ *B. thuringiensis* ในการป้องกันกำจัดไม่ได้ อาจเนื่องมาจากการเลือกสายพันธุ์เชื้อ *B. thuringiensis* เพราะเชื้อ *B. thuringiensis* แต่ละสายพันธุ์จะมีประสิทธิภาพและ ความรุนแรงในการป้องกันกำจัดไม่เหมือนกัน แม้แต่ในปัจจุบันเชื้อ *B. thuringiensis* ที่ใช้จะให้ผลเป็นที่น่าพอใจแต่ในอนาคตอาจพบสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีกว่า

งานวิจัยทางด้าน molecular biology บอกให้ทราบรายละเอียดเกี่ยวกับ *B. thuringiensis* อีกมากมาย

2.11 งานทางด้าน molecular biology ทำให้ทราบถึง

2.11.1 จำนวนยีนที่เป็นตัวกำหนดสารพิษของ *B. thuringiensis* แต่ละสายพันธุ์

2.11.2 ปริมาณยีนชนิดต่างๆที่พบบนพลาสมิด

2.11.3 สารพิษ (crystal) ของ *B. thuringiensis* ประกอบด้วยโปรตีนชนิดใด

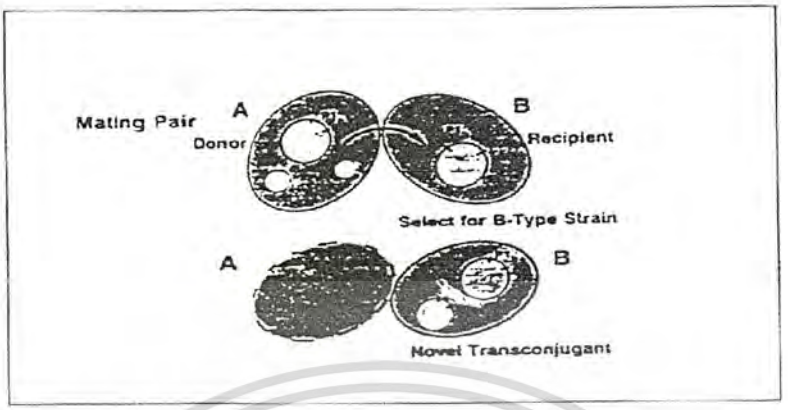
2.11.4 คุณสมบัติของ protoxin ในการทำให้เกิดโรคกับชนิดของแมลง

2.11.5 โครงสร้าง DNA

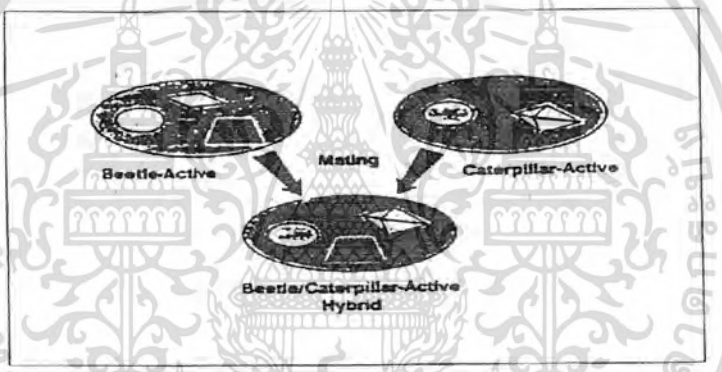
ปัจจุบันการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *B. thuringiensis* ทำได้หลายวิธี คือ

1. คัดเลือกจากสายพันธุ์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ
2. การทำ transgenic plants
3. การใส่สารพิษ B.t. เข้าไปในจุลินทรีย์ชนิดอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อ BT โดยวิธี
Conjugal Transfer



<u>ภาพที่ 4</u> การสร้างสายพันธุ์ *B. thuringiensis* ที่มีประสิทธิภาพควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด
ที่มา : Aizawa และคณะ (1975)

นอกจากการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *B. thuringiensis* แล้วยังมีการใช้ *B. thuringiensis* ผสมกับยาปฏิชีวนะพวก chlorotetracycline (cte) ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชให้สูงขึ้นอีกด้วย

Cantwell และ คณะ (1983) ได้ทำการทดลองใช้ Certan™ (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) จากบริษัท Sandoz ในการควบคุมผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่ในโรงเก็บคอนผึ้งที่เมือง Beltsville ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อปี ค.ศ. 1979 ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 35-68 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการใช้ Certan™ ที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ สามารถป้องกันการทำลายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งได้ 100% ส่วนที่ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแผ่นรวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รังผึ้ง มีการถูกทำลายเพียงเล็กน้อย และสามารถป้องกันได้นานถึง 12 เดือน และบริษัท Sandoz ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของยา SAN 401 ใน

การป้องกันกำจัดผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งที่เมือง Basel ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ พบว่าที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการทดลอง 1 เดือน สามารถป้องกันการเข้าทำลายได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในแผ่นรวงรังผึ้งที่ยังไม่มีตัวหนอนเข้าทำลาย ส่วนแผ่นรวงรังผึ้งที่ถูกตัวหนอนเข้าทำลายบ้างจะหยุดการทำลายในที่สุด และสามารถป้องกันได้นานถึง 8 เดือน

Vandenberge และ Shimanuki (1986) ได้ทำการทดลองความคงทนและประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* ในการป้องกันกำจัดหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ โดยวิธีการฉีดพ่นลงในแผ่นรวงรังของผึ้ง พบว่า *B. thuringiensis* ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีประสิทธิภาพลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ *B. thuringiensis* ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และพบว่าสปอร์สามารถคงทนอยู่ได้ในหีบเลี้ยงผึ้งนานถึง 10-20 สัปดาห์ โดยที่สามารถป้องกันการเข้าทำลายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้นในประเทศไทยได้มีการแยกสายพันธุ์ *B. thuringiensis* เพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก และควบคุมปริมาณลูกน้ำยุงต่างๆ ได้แก่ ลูกน้ำยุงก้นปล่อง และ ยุงลาย ซึ่งเป็นพาหะนำโรคไข้มาลาเรีย และ ไข้เลือดออก โดยการนำผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดหนอนแมลงที่มี *B. thuringiensis* เป็นส่วนประกอบที่สำคัญมาใช้ในการควบคุมหนอนใยผัก สายพันธุ์ของ *B. thuringiensis* ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีประมาณ 5 สายพันธุ์ เช่น *aizawai kurstake israelensis sandiego* และ *tenebrionis* บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษทำลายหนอนผีเสื้อในกลุ่ม Lepidoptera บางสายพันธุ์ใช้ควบคุมลูกน้ำยุง ในอันดับ Diptera ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการควบคุมการสร้างผลึกโปรตีน (Cry gene) ซึ่งเหล่านี้ได้ถูกแยกขยายและตัดต่อโดยเทคนิคทางพันธุกรรม เพื่อนำไปสู่การปรับปรุงสายพันธุ์ *B. thuringiensis* ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่น การนำยีน CryrIA (a) เข้าสู่ *B. thuringiensis* ทำให้จุลินทรีย์สร้างผลึกสารพิษที่ทำลายหนอนผีเสื้อ Phertella xylostel ในกลุ่ม Lepidoptera ได้ นอกจากการคัดเลือกสายพันธุ์และการปรับปรุงส่วนผสม (formulation) ให้เหมาะสมแล้วยังมีการใช้เอนไซม์ไคติเนสเป็นส่วนผสมกับ *B. thuringiensis* เพิ่มประสิทธิภาพการทำลายหนอนวัยต่างๆให้ได้ดียิ่งขึ้น

อัจฉรา (2534) ได้ทำการทดลองกับหนอนม้วนใบ (*Archips* sp.) โดยใช้ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ชนิดผง ,Flobac ชนิดน้ำเข้มข้น และสายพันธุ์ TNR-2 ที่ผลิตขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ พบว่าการใช้แบคทีเรียจะให้ประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดได้ดีกว่าการใช้สารเคมี

การใช้ *B. thuringiensis* ควบคุมแมลงต่างๆ การที่จะประสบความสำเร็จ หรือ มีประสิทธิภาพสูงยังขึ้นอยู่กับวิธีการใช้ การพ่นให้เป็นฝอยเล็กๆจะเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าแมลงได้

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงขึ้นและได้มีการนำเอา *B. thuringiensis* ผสมกับยาฆ่าแมลง จากการทดลองกับหนอน *Ostrinia nubilalis* และ *Helicoverpa zea* ในข้าวโพดหวาน พบว่า *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* สามารถเพิ่ม ประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดได้มากขึ้น

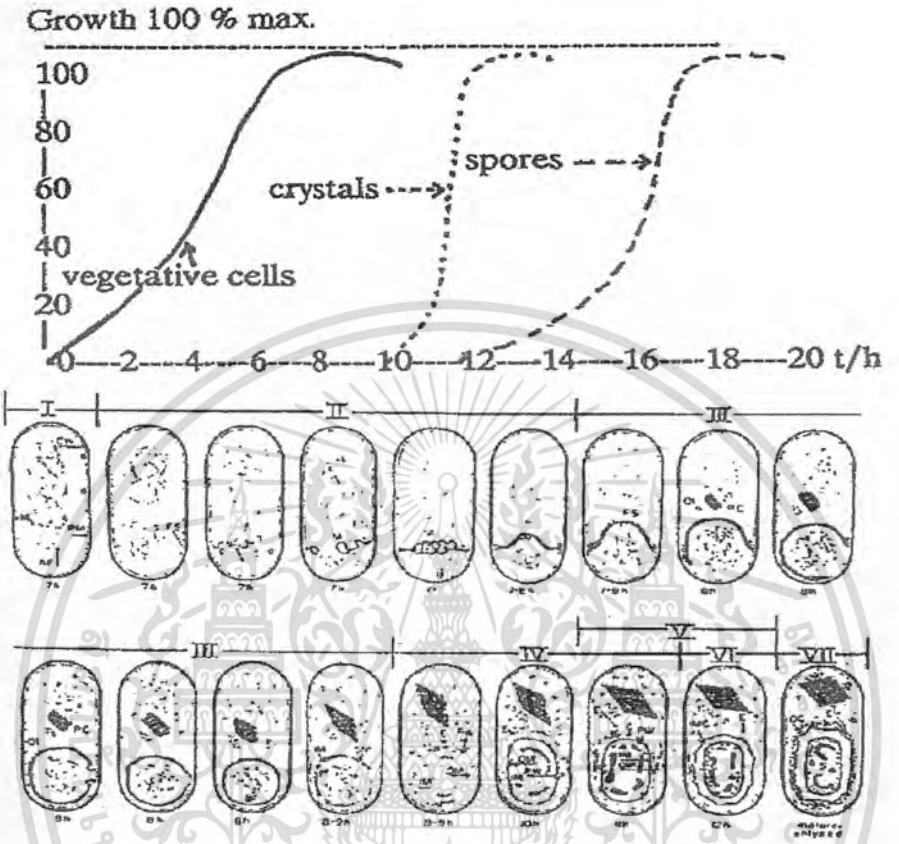
2.12 การเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis*

B. thuringiensis สามารถเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณมากๆ โดยอาศัยกระบวนการหมัก (fermentation process) ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว (submerged culture) ในภาชนะขนาดใหญ่ บรรจุอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของแร่ธาตุต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยมีการควบคุมอุณหภูมิ พีเอช และ การถ่ายเทอากาศในถังหมักอย่างเหมาะสม *B. thuringiensis* จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว จากนั้นจะผ่านกระบวนการแยก *B. thuringiensis* ออกจากอาหารเหลว โดยผลิตภัณฑ์ที่ออกมาจะอยู่ในรูปผงละลายน้ำ น้ำเข้มข้น เป็นต้น

ในระหว่างการหมัก *B. thuringiensis* เริ่มแรกจะเพิ่มจำนวนในสภาวะการเจริญเติบโต (vegetative phase) เมื่อส่วนประกอบในสารอาหารถูกนำไปใช้หมด มันจะเข้าสู่ระยะการสร้างสปอร์ (Sporulation stage) และ crystal protein จะถูกสร้างขึ้นระหว่างสภาวะนี้ ภายหลังสิ้นสุดการสร้างสปอร์ เซลล์จะแตกออกเพื่อปล่อย spore และ crystal protein

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.13 การเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเซลล์



ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของเซลล์ควบคู่ไปกับการสร้างสปอร์ และ ผลึกโปรตีน
ที่มา : http://www.fao.org/docrep/t0533e/t0533e04.htm# 2.2.1

2.14 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis*

การเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* ในประเทศจีนทำกันในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่โดยใช้กระบวนการหมักในอาหารเหลว ได้แก่ รำข้าวสาลี เศษเมล็ดข้าวโพดบด ถั่วเหลือง กากเมล็ดฝ้ายที่คั้นน้ำออกแล้ว โดยมีเศษถั่วเหลืองบดเป็นองค์ประกอบหลักของอาหาร Hubei Academy of Agriculture Sciences ทำการเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* ได้ 26 ตัน ในปี ค.ศ. 1983 90 ตัน ในปี ค.ศ. 1984 160 ตัน ในปี ค.ศ. 1985 260 ตัน ในปี ค.ศ. 1986 360 ตัน ในปี ค.ศ. 1987 472 ตัน ในปี ค.ศ. 1988 732 ตัน ในปี ค.ศ. 1989 และ 900 ตัน ในปี ค.ศ. 1990 มีการใช้เชื้อดังกล่าวมากกว่า 30 มณฑลในประเทศจีนใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูทางการเกษตรและป่าไม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคาดการณ์ว่าหลังปีค.ศ. 1990 จะผลิตได้ 1,500 ตัน เพื่อออกจำหน่ายสู่ประเทศไทย และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Entwistle และ คณะ,1993)

การเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* ในอียิปต์ เชื้อที่ทำการผลิตได้แก่ *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* HD-234 และ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-341 โดยการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลูกบาศก์เมตร ใช้กากยีสต์และกากน้ำตาลเป็นอาหารในการเพาะเลี้ยง อัตราที่ใช้คือ กากยีสต์ 40 g/l กากน้ำตาล 15 g/l K_2HPO_4 1 g/l และ $MgSO_4$ 7 g/l ในน้ำ 1 ลิตร ผลิตภัณฑ์ที่ได้ใช้ในการป้องกันกำจัด Spodoptera littoralis greasy cutworm (*Agrotis ipsilon*) , *Pectinophora gossypiella* และ spiny bollworm (*Earias insulana*) (Entwistle และ คณะ, 1993)

การเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จของ *B. thuringiensis* ส่วนใหญ่ใช้อาหาร GYS (Glucose-Yeast extract-Salt) ประกอบด้วย glucose 5 g/l yeast extract 5 g/l $(NH_4)_2SO_4$ 4 g/l K_2HPO_4 1 g/l $MgSO_4.7H_2O$ 0.82 g/l $CaCl_2.2H_2O$ 0.08 g/l $MnSO_4.H_2O$ 0.07 g/l และ H_2O ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ปรับพีเอช เท่ากับ 7.0 ด้วย 4N KOH และทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Kang และคณะ, 1993)

Bulla และคณะ (1970) ทำการเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* NRRL NRS-996 *B. alvei* NRRL B-384 *B. lentimorbus* NRRL B-2522 และ *B. popilliae* NRRL B-2309 ในอาหารเหลว (JB) ที่ประกอบด้วย yeast extract 1.5 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4 0.6 เปอร์เซ็นต์ และ glucose 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอช เท่ากับ 7.4 ทำการเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าด้วยใช้ฟลาสก์ ใช้อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

Nickerson และคณะ (1974) ทำการเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* 12 serotypes โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ GYS ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 0.2% $(NH_4)_2SO_4$ 0.2 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอช เท่ากับ 7.3 และเติม glucose 0.1% $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% $CaCl_2.2H_2O$ 0.005% และ $MnSO_4.H_2O$ 0.005 เปอร์เซ็นต์ ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงไปทีหลังในฟลาสก์ และทำการเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าโดยใช้อัตราการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที สำหรับใน *B. thuringiensis* var. *entomcidus* ได้มีการเติม glucose-glutamate salts และ glucose-aspartate salts ลงไปด้วยตามวิธีของ Nickerson และ Bulla (1994)

นอกจากนั้นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* ยังมีสูตรอาหารอื่นๆอีก เช่น ในประเทศเกาหลีใต้ใช้ปลาป่น ถั่วเหลือง red bean sesame dregs ข้าว และ รำข้าว (Yoon และคณะ, 1987) ในประเทศจีนมีการใช้รำข้าวสาลี เปลือกข้าว lime powder cottonseed cake และ corn meal (Hussey และ Tinsley, 1981) ประเทศไนจีเรียใช้ fermented cassava ground whole maize และ whole cowpeas (Ejiofar และ Okafor, 1989) ประเทศบราซิลใช้เซลลูโลสจากใยกระดาษกับ soluble starch

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Moscardi, 1988) ในอินเดีย ใช้แป้งที่ทำจากเมล็ดถั่วต่างๆ ผสมกับ soluble starch หรือ กากน้ำตาล หรือ กากน้ำตาล (Mummigatti และ Raghunathan, 1993) ประเทศเม็กซิโกมีการใช้กากน้ำตาล แป้งถั่วเหลือง น้ำแช่ข้าวโพด และ $CaCO_3$ (Entwistle และคณะ, 1993) เป็นต้น

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยอุปกรณ์ที่เราเรียกว่าหม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) ที่ความดัน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-30 นาที ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงนั้นๆ (บัญญัติ,2525)

2.15 สภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเบ็ดเสร็จของ *B. thuringiensis*

ในกระบวนการเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* จะเริ่มในฟลาสก์ ที่มี NB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะถ่ายมาจาก stock ของ *B. thuringiensis* ในอาหารแข็ง หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าพร้อมทั้งควบคุมสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสมในฟลาสก์ ขนาด 300 มิลลิลิตร ประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงสู่ฟลาสก์ที่สองขนาด 6 ลิตร หรือ ถังหมักขนาด 6 ลิตร โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบไปด้วย กากน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำแช่ข้าวโพดแห้ง 0.85 เปอร์เซ็นต์ และ $CaCO_3$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงไว้นาน 24 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ จากนั้นทำการถ่ายลงสู่ถังหมักขนาดใหญ่ สำหรับปริมาณการใช้กล้าเชื้อต่อถังหมักเป็นสิ่งสำคัญในการหมักเชื้อซึ่งปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมประมาณ 0.5-2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) ถ้าใช้กล้าเชื้อปริมาณน้อยๆจะส่งผลให้ช่วง lag phase นานขึ้น แต่จะไม่มีผลแตกต่างในเรื่องผลิตภัณฑ์ที่ได้ (Lisansky และ Quinlan, 1993)

ในการหมัก *B. thuringiensis* ในถังหมักต้องควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิประมาณ 27-33 องศาเซลเซียส สภาวะที่เหมาะสมคือที่ 30 องศาเซลเซียส พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงตลอดในการหมัก ประมาณ 6.5-7.5 สภาวะเหมาะสมคือ 7.0 (Lisansky และ Quinlan, 1993) การให้อากาศในถังหมักปกติอากาศที่ให้ในถังหมักได้มาจากเครื่องอัดอากาศแล้วผ่านเข้าเครื่องกรองอากาศที่สามารถกรองจุลินทรีย์ได้ เครื่องกรองอากาศที่ใช้กันอยู่มีหลายชนิด ทั้งที่ทำด้วยโลหะ แก้ว เซรามิก หรือ ทำเป็นแผ่นกรองหลายๆแผ่นต่อกัน (multi-plate millipore filter) เมื่ออากาศผ่านเข้าเครื่องกรองอากาศแล้วพ่นเข้าสู่อาหารเหลวที่ก้นถังหมัก ฟองอากาศที่ออกมาจะต้องมีขนาดเล็กพอสมควร เพื่อให้ออกซิเจนในอาหารซึมผ่านสู่อาหารเหลวได้ดี หัวฉีดที่นิยมใช้มีอยู่ด้วยกัน 3 รูปแบบ คือ single jet nozzle sintered diffuser และ sparger แบบแรกใช้กับถังหมักขนาดเล็กในห้องปฏิบัติการ ส่วน 2 แบบหลังใช้กับการหมักแบคทีเรียและยีสต์ อย่างไรก็ตามการให้อากาศไปในระหว่างการหมัก ต้องควบคุมปริมาณให้คงที่และพอเหมาะต่อการใช้ของเชื้อจุลินทรีย์ ถ้ามากเกินไปอาจก่อปัญหาในระหว่างการหมัก เช่น การเกิดฟอง ดังนั้นจึงต้องใช้เครื่องควบคุมอัตราการให้อากาศ ซึ่งเรียกว่า flow meter (วราวุฒิ, 2535) การฆ่าเชื้ออากาศโดยการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรองอาจจะใช้แผ่นกรองในการกรองอากาศ และอัตราเร็วของใบกวนจะปรับตามอัตราการให้อากาศ และ อัตราเร็วของใบกวนจะขึ้นอยู่กับขนาดและลักษณะของถังหมัก ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ โดยทั่วไปอัตราการให้อากาศจะประมาณ 1.0 vvm อัตราการกวนของใบพัดประมาณ 600-800 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาดเล็ก ส่วนถังหมักขนาดใหญ่ตั้งแต่ 500 ลิตรขึ้นไป อัตราการให้อากาศประมาณ 0.3 vvm อัตราการกวน 120-160 รอบต่อนาที (Lisansky และ Quinlan, 1993)

Jong (1994) ได้ใช้ถังหมักแบบ Stirred-tank reactor, Bubble column และ Air-lift reactor ที่มี net draft tube มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* แบบเบ็ดเสร็จ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ถังหมักที่มีลักษณะที่แตกต่างกันจะให้เซลล์ที่มีรูปร่างต่างกัน และแรงเฉือนในถังหมักมีผลกระทบอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. thuringiensis* และต่อการผลิตสาร thuringiensin เพราะถังหมักแบบ air-lift reactor ที่มี net draft tube ซึ่งสามารถให้ผลผลิตของสาร thuringiensin ที่สูงที่สุด จะให้ปริมาณการถ่ายโอนออกซิเจนที่สูง และ แรงเฉือนที่ต่ำ

Jong และคณะ (1995) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (HD-199) ในถังหมักแบบ air-lift reactor ที่มี net draft tube ทำการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว โดยการค่อยๆให้ แหล่งคาร์บอน ซึ่งก็คือ glucose และแหล่งไนโตรเจน ซึ่งก็คือ soy flour และ $(NH_4)_2SO_4$ ลงไปในระหว่างการหมัก โดยแบ่งการให้เป็น 2 ส่วน คือ ส่วน A จะมี glucose 100 g/l และ soy flour 150 g/l และส่วน B จะมี glucose 200 g/l soy flour 100 g/l และ $(NH_4)_2SO_4$ 40 g/l โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับการหมักแบบเบ็ดเสร็จ ซึ่งให้ผลการทดลองว่า กระบวนการหมักแบบครั้งคราวจะให้ผลผลิตของสาร thuringiensin สูงกว่ากระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ เนื่องจากแบบครั้งคราวจะมีการเติมสารตั้งต้นลงไปทำให้เซลล์มีช่วงการเจริญที่นานกว่าแบบเบ็ดเสร็จ และกระบวนการหมักแบบครั้งคราวเป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ทำเพื่อป้องกันการยับยั้งจากสารตั้งต้น หรือสารเมตาบอไลท์ และ การทดลองดังกล่าวยังให้ผลอีกว่า ความต้องการออกซิเจนในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสาร thuringiensin จะมีปริมาณสูงอีกด้วย

การป้องกันการเกิดฟองในระหว่างการหมัก อากาศที่พ่นเข้าไปในถังหมักและถูกใบพัดกวนตีแตกเป็นฟองอากาศขนาดเล็กๆมากมาย ทำให้เกิดฟองบนผิวหน้าของอาหารเหลวมากมายเกิดขึ้นเนื่องมาจากการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จะขับสารประกอบพวกโปรตีนและเปปไทด์ออกมาอาหารเหลวจึงมีความหนืดสูงขึ้น ฟองที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้มีประสิทธิภาพการถ่ายเทอากาศระหว่างอาหารเหลวกับบรรยากาศลดลง นอกจากนี้ถ้ามีฟองมากจนล้นออกจากถังหมักฟองอากาศที่แตกสลายกลับลงไปในถังหมักจะก่อให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆได้ ดังนั้นควรเติมสารกำจัดฟอง (antifoam) ในปริมาณเล็กน้อยเพื่อทำให้ฟองสลายตัวได้ เนื่องจากสารเคมีเหล่านี้จะไปช่วยลดแรงตึงผิวของอาหารเหลว (วราวุฒิ, 2535) สารที่ใช้กำจัดฟองได้แก่ silicone และ

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

polypropylene glycol หรืออาจใช้ใบพัดตีฟองให้แตกควบคู่ไปกันด้วย (สาโรจน์, ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์)

Huang และคณะ (2001) ได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (HD-199) ในถังหมักแบบ air-lift reactor ที่มี double wire mesh draft tube โดยทำการเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบ bubble column ได้ผลการทดลองว่าการผลิตสาร thuringiensin ในถังหมักแบบ air-lift reactor โดยใช้สาร antifoam KM72 ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์น้อย จะให้ผลผลิตสูงถึง 2.3 เท่า ของการหมักในถังหมักแบบ bubble column ภายใต้สภาวะเดียวกัน และเมื่อให้อัตราการให้อากาศที่เหมาะสม การผลิตสาร thuringiensin ในถังหมักแบบ air-lift reactor จะสูงกว่า 1.7 เท่า ของการใช้วิธีการควบคุมฟองแบบทั่วไปด้วยการเติมสาร antifoam เนื่องจากสาร antifoam จะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการถ่ายโอนออกซิเจน หากใช้วิธีการกำจัดฟองด้วยการเติมสาร antifoam จึงจำเป็นที่จะต้องเลือกสาร antifoam ที่เหมาะสมในการทดลองนั้นๆ และในการใส่สาร antifoam จะไม่เติมในระหว่างระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโต

Singer และ Rogoff (1968) ทำการศึกษากรดอะมิโนที่มีผลต่ออาหารในการเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* Berliner ซึ่งพบว่า กรดอะมิโน leucine isoleucine serine threonine และ glycine มีผลในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ ส่วน valine และ methionine ไม่มีผลในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ

Pearson และ Ward (1988) เพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* var. *israelensis* ในถังหมักขนาด 40 ลิตร โดยใส่กล้าเชื้อที่ชั่วโมงเริ่มต้นและ 48 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยงพบว่าได้จำนวนเซลล์มีชีวิตสูงถึง $6.5x10^9$ cells/ml และมีเปอร์เซ็นต์การสร้างสปอร์ ถึง 95 เปอร์เซ็นต์

Selinger และคณะ (1988) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ในถังหมักขนาด 1 ลิตร ในอาหาร NB ที่ประกอบด้วย nutrient broth 0.8 เปอร์เซ็นต์ NaCl 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กล้าเชื้อ 50 มิลลิลิตร ที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 170 มิลลิลิตรต่อวินาที พบว่าการเติบโตและการใช้สารอาหารเพิ่มขึ้นสูงขึ้นในช่วง 8 ชั่วโมงหลังการเพาะเลี้ยง จากการส่องดูเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์เชื้อจะมีการแบ่งเซลล์สูงขึ้นในช่วง 3-11 ชั่วโมง และเริ่มมีการสร้างสปอร์หลังชั่วโมงที่ 11 สำหรับการสร้าง insecticide crystalline protein (ICP) จะพบว่าเพิ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 50 ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.16 ผลิตภัณฑ์ของ *B. thuringiensis* ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

ผลิตภัณฑ์ของ *B. thuringiensis* ที่จำหน่ายในท้องตลาดและขึ้นทะเบียนการค้าเรียบร้อย แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลิตภัณฑ์ของ *B. thuringiensis* ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

ชื่อผลิตภัณฑ์	ตัวแทนจำหน่าย
แบคโตสปีน® (Bactospeine®)	บริษัท เทพวัฒนาเคมี จำกัด
เซนทารี® (Centari®)	บริษัท เฮิกซ์ เซริง อากริโว จำกัด
เดลฟิน® (Delfin®)	บริษัท อินซแคป เคมีคัล ซัพพลายส์ จำกัด
ไดเพล® (Dipel® WP)	บริษัท อีคลิปส์ จำกัด
ธูริไซด์ เอชพี (Thuricide® HP)	บริษัท อินซแคป เคมีคัล ซัพพลายส์ จำกัด
ทูแรกซ์ 50® ดับลิวพี (Turex 50® WP)	บริษัท ซีบา-ไกกี้ (ประเทศไทย) จำกัด

ที่มา : จริยา และคณะ (2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *B. thuringiensis* JC590

เชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. จริยา จันทร์ไพแสง ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

เตรียมกล้าเชื้อโดยการเขี่ยเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 จำนวน 2 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่า ควบคุมความเร็วรอบที่ 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง วัดค่าความขุ่นของเซลล์ได้ประมาณ 1.5-1.8

3.2 ศึกษาผลความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิในอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเติบโตและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับฟลาสก์

ถ่ายกล้าเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และน้ำอามิ-อามิที่แปรผันระดับความเข้มข้นที่ 2.5 5.0 10.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร (%V/V) ตามลำดับ ปรับพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.0 ทำการเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง จนถึง ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการวิเคราะห์หา

- จำนวนเซลล์มีชีวิตทั้งหมด (cfu/ml) (ภาคผนวก ข)
- ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)
- น้ำหนักแห้ง (g/l) (ภาคผนวก ข)
- วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (Anson, 1983) (ภาคผนวก ข)
- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี Somogyi Nelson (Nelson, 1944;Somogyi, 1952) (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ศึกษาการเติบโต การสร้างสปอร์ และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับถังหมัก

ถ่ายกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของเชื้อที่ได้จากการทดลองที่ 3.2 น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 7.0 เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมพีเอชของอาหารเท่ากับ 7.0 อัตราการกวนให้อากาศ 1,000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 1-4 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการวิเคราะห์หา

- จำนวนเซลล์มีชีวิตทั้งหมด (cfu/ml) (ภาคผนวก ข)
- จำนวนสปอร์ทั้งหมด (cfu*/ml) (ภาคผนวก ข)
- ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)
- น้ำหนักแห้ง (g/l) (ภาคผนวก ข)
- วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (Anson, 1983) (ภาคผนวก ข)
- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี Somogyi Nelson (Nelson, 1944 ; Somogyi, 1952) (ภาคผนวก ข)

3.4 ศึกษาการเติบโต การสร้างสปอร์ และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 โดยแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในถังหมัก 2 ระดับ ในช่วงเริ่มต้นของการเติบโตคงที่ (stationary phase)

ถ่ายกล้าเชื้อประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการแปรผันปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเพาะเลี้ยง (Dissolved Oxygen ; DO) จาก 100 เปอร์เซ็นต์ เป็น 50 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในช่วงเริ่มต้นของการเติบโตในระยะคงที่ (stationary phase) ทำการควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส พีเอช เท่ากับ 7.0 ทำการหมักและเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หา

- จำนวนเซลล์มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย cfu/ml (ภาคผนวก ข)
- จำนวนสปอร์ทั้งหมด (cfu*/ml) (ภาคผนวก ข)
- ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)
- น้ำหนักแห้ง (g/l) (ภาคผนวก ข)
- วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (Anson, 1983) (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี Somogyi Nelson (Nelson, 1944 ; Somogyi, 1952) (ภาคผนวก ข)

3.5 ศึกษาการเก็บรักษาเชื้อ *B. thuringiensis*

หลังจากการหมักสิ้นสุดลง (ชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง) ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักจากถังหมักทันทีด้วยวิธีการปลอดเชื้อ ลงในขวดอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปิเปตน้ำหมักจากขวดอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยให้เป็นหลอดควบคุม

ทำการศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อภายใต้อุณหภูมิห้อง (room temperature) และ อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส (Deep Freeze temperature) โดยแบ่งเป็น 5 วิธีดังนี้

3.5.1 การทดลองการเก็บรักษาเชื้อวิธีที่ 1

3.5.1.1 ปิเปตน้ำหมักในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยงปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง พลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.5.1.2 เติมน้ำมันปริมาตร 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องและ อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส อย่างละ 2 หลอด

3.5.2 การทดลองการเก็บรักษาเชื้อวิธีที่ 2

3.5.2.1 ปิเปตน้ำหมักในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยงปริมาตร 7.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง พลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.5.2.2 เติมน้ำมันปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง และ อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส อย่างละ 2 หลอด

3.5.3 การทดลองการเก็บรักษาเชื้อวิธีที่ 3

3.5.3.1 ปิเปตน้ำหมักในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยงปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.5.3.2 เติมไข่แดงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตรและน้ำมันปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้น นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง และ อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส อย่างละ 2 หลอด

3.5.4 การทดลองการเก็บรักษาเชื้อวิธีที่ 4

3.5.4.1 ปิเปตน้ำหมักในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยงปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง พลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นเท ส่วนใสทิ้ง

3.5.4.3 ปิเปตหางนมผงปริมาตร 3 มิลลิลิตร และ น้ำมันปริมาตร 7 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง

3.5.4.4 นำไปแยกเก็บที่อุณหภูมิห้อง และ อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส อย่างละ 2 หลอด

3.5.5 การทดลองการเก็บรักษาเชื้อวิธีที่ 5

3.5.5.1 ปิเปตน้ำหมักในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยงปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.5.5.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีจากนั้นเท ส่วนใสทิ้ง

3.5.5.3 ปิเปตน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.5.5.4 ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ–18 องศาเซลเซียส อย่างละ 2 หลอด

เมื่อทำการเก็บรักษาเชื้อตามวิธีทั้ง 6 วิธีแล้ว จะทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมา spread plate หาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ และ เปอร์เซ็นต์ของสปอร์ทั้งหมด ในวันที่ 1 7 และ 37 ตามลำดับ และทำการเปรียบเทียบผลที่ได้เพื่อหาวิธีการที่ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ และเปอร์เซ็นต์ของสปอร์ทั้งหมดสูงที่สุด เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเก็บรักษาเชื้อ *B. thuringiensis* ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

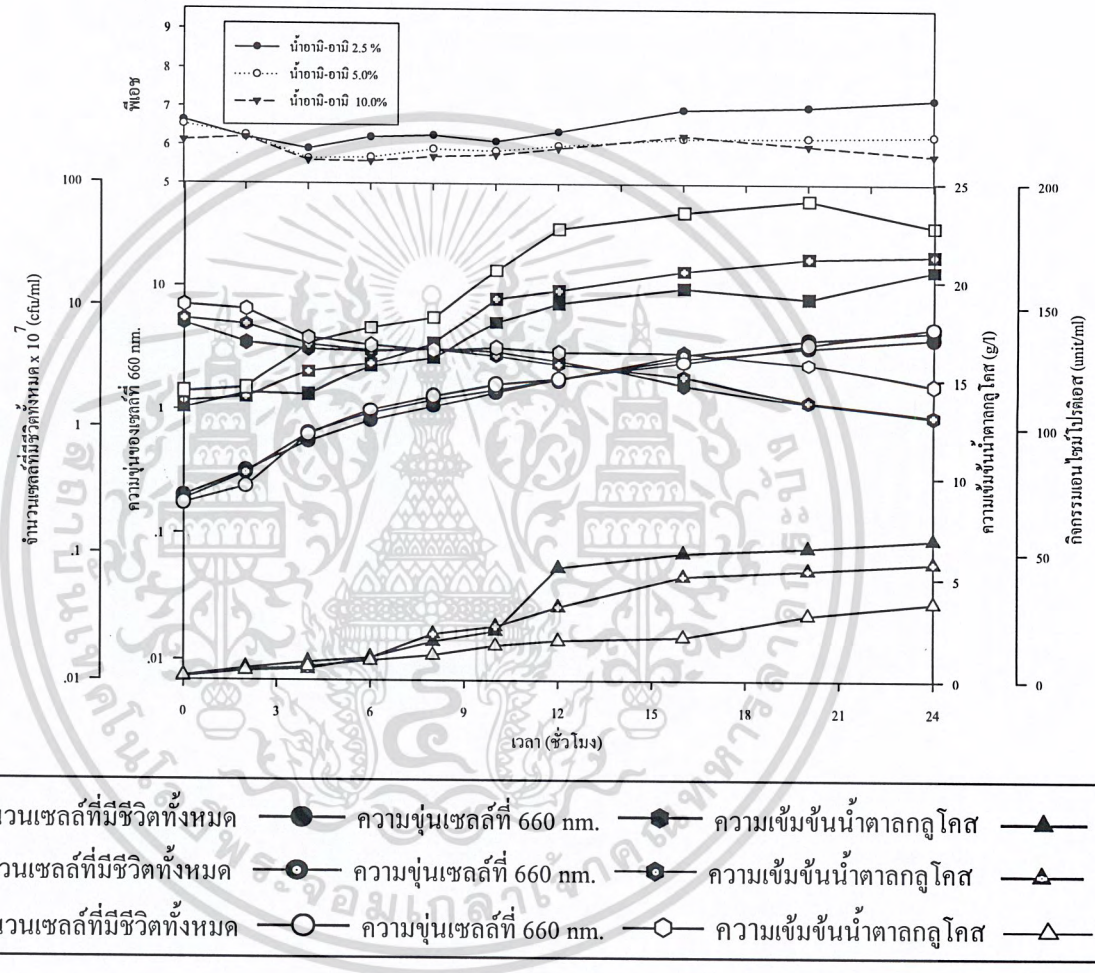
บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิในอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเติบโตและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับฟลาสก์

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ อามิ-อามิ ที่แปรผันความเข้มข้น เป็น 3 ระดับคือ 2.5 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยปรับพีเอชเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ 7.0 ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอัตราการเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 6) ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดทั้งหมดเท่ากับ 1.94×10^8 2.59×10^8 และ 5.0×10^8 cfu/ml ที่ความเข้มข้นของน้ำอามิ- อามิ 2.5 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 24 24 และ 20 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ

แหล่งไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ มีอิทธิพลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *B. thuringiensis* และ โปรตีนสร้างสารพิษ โดยจากรายงานของ Bulla (1980) พบว่าสารประกอบอนินทรีย์พวกแอมโมเนีย (เช่น แอมโมเนียมไดซัลเฟต) อย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ แหล่งไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ เช่น meat peptone หรือ soybean flour จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ *B. thuringiensis* ให้มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และมีปริมาณที่สูง เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนจากสารอินทรีย์จะมีปริมาณของกรดอะมิโนหลายชนิด ซึ่ง *B. thuringiensis* สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งจะพบว่าที่ความเข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำ อามิ–อามิ ให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดมากที่สุดโดยอาจเป็นเพราะที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. thuringiensis* อยู่มาก ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานข้างต้น และจากการรายงานของ Aronson และคณะ (1975) ซึ่งศึกษาถึงวิถีกรดแกรมมา-อะมิโนบิวทิริก และ การปรับปรุงวิถีของวัฏจักร tricarboxylic acid ในระหว่างการเจริญเติบโตของและการสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. thuringiensis* พบว่าเชื้อ *B. thuringiensis* สามารถสร้างและสลายสารประกอบไนโตรเจน โดยผ่านเอนไซม์ alanine dehydrogenase และ glutamate dehydrogenase ได้เป็นกรดอะมิโน alanine และ glutamic ซึ่งกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดมีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยที่น้ำอามิ-อามิที่ใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงในการทดลองนี้มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวนี้ในปริมาณที่สูง ดังนั้นจึงสนับสนุนผลการทดลองข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิในการเพาะเลี้ยงต่อการเติบโต การใช้น้ำตาลกลูโคสและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับฟลาสก์เขย่า ที่ควบคุมอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4 พารามิเตอร์ ต่างๆที่ได้จากการแปรผันความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ ในอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเติบโตของเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับ ฟลาสก์

ความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ (%)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด		ความขุ่นเซลล์ที่ 660 nm.	
	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ x 10^{10} (cfu.g glucose^{-1})	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ x 10^{10} (l.g glucose^{-1})
2.5	0.212	3.777	0.235	1.189
5.0	0.245	5.749	0.278	1.281
10.0	0.269	10.399	0.287	1.551

หมายเหตุ μ : อัตราการเติบโตจำเพาะ $Y_{x/s}$: ผลได้ของเซลล์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส

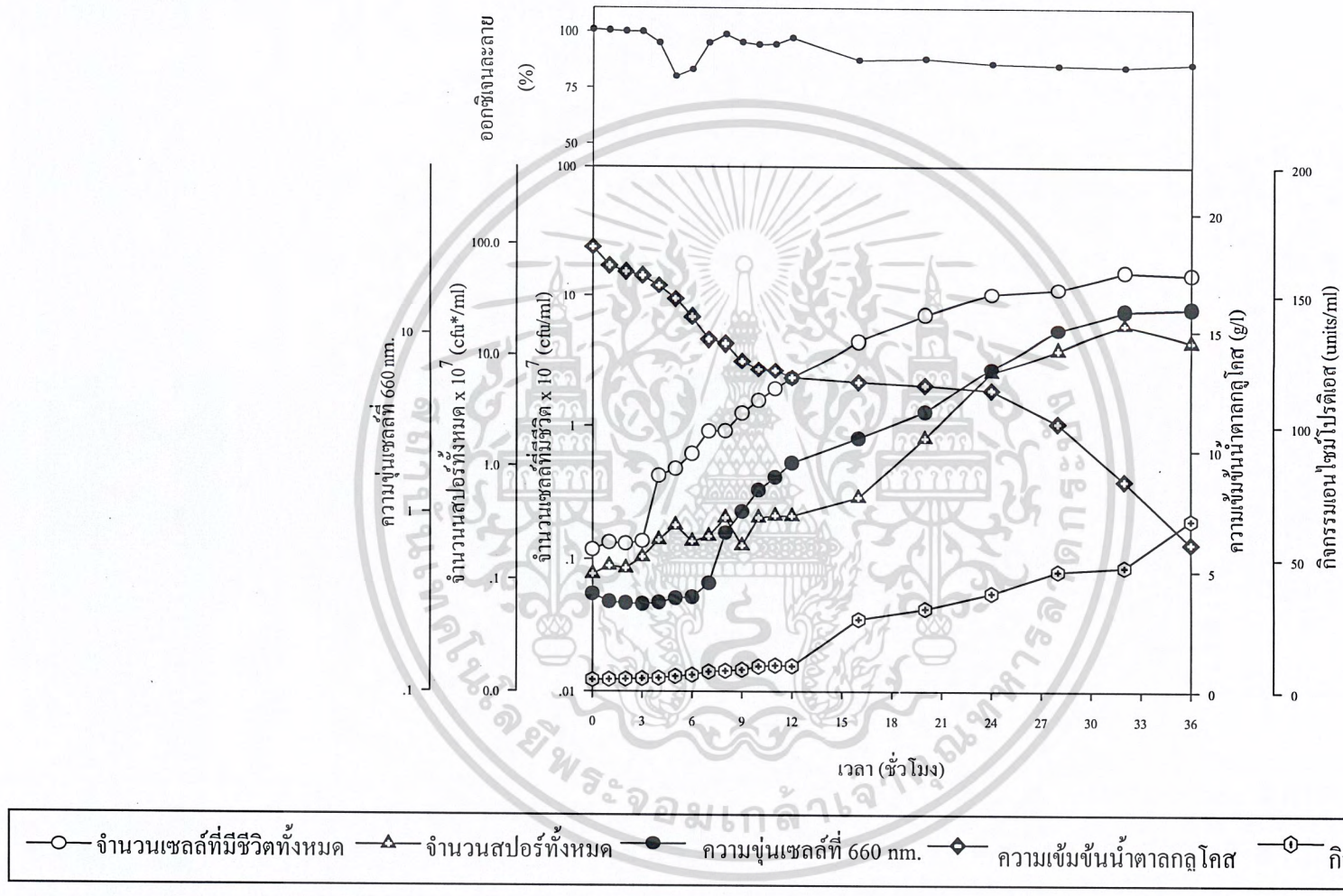
จากตารางที่ 4 พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ที่ความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ 10.0 เปอร์เซ็นต์ให้อัตราจำเพาะของการเติบโตจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด และความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตรสูงที่สุดเท่ากับ 0.269 และ 0.287 h^{-1} ตามลำดับ และผลได้ของเซลล์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส ($Y_{x/s}$) จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และ ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตรได้เท่ากับ 10.399x10^{10} cfu.g glucose^{-1}และ 1.551 l.g glucose^{-1} ตามลำดับ จะเห็นว่าทั้งอัตราการเติบโตจำเพาะและผลได้ของเซลล์จากการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ 10.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิที่ 2.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะสอดคล้องกับเหตุผลข้างต้นที่ว่า ในน้ำอามิ-อามิ 10.0 เปอร์เซ็นต์ น่าจะมีปริมาณของกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อการเติบโตของเชื้ออยู่ในปริมาณที่สูงกว่าที่ความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ 2.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เชื้อมีการใช้แหล่งอาหารดังกล่าวควบคู่ไปกับการใช้แหล่งน้ำตาลกลูโคส เชื้อจึงมีการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนเซลล์ในปริมาณที่สูงกว่า จึงทำให้ผลได้ของเซลล์จากการใช้น้ำตาลกลูโคสสูงเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาการเติบโต การสร้างสปอร์ และ กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของ *B. thuringiensis* JC 590 ในถังหมัก

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วยน้ำอามิ–อามิ ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 10.0 เปอร์เซ็นต์ โดยควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส พีเอชของอาหารเท่ากับ 7.0 โดยการเติม NaOH และ H_3PO_4 ความเข้มข้น 2 N ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยกำหนดความเร็วรอบของการกวนของใบพัดที่ 1,000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เติมกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยง ในถังหมักขนาด 2 ลิตร สามารถวัดการเติบโตของเชื้อจากการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้สูงสุดเท่ากับ 1.54×10^8 cfu/ml ในชั่วโมงที่ 32 ของการเพาะเลี้ยง โดยการเจริญเติบโตจะเข้าสู่ช่วง exponential growth phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 จนถึง ชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง และหลังจากชั่วโมงที่ 16 จนถึงชั่วโมงที่ 36 จะเป็นช่วง stationary phase ซึ่งสามารถวัดความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตรได้สูงสุด เท่ากับ 14.026 ในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง จะเห็นว่าช่วงของการเจริญเติบโตเป็นไปในแนวเดียวกับการเติบโตที่วัดจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 ผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ควบคุมอัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.0

ตารางที่ 5 พารามิเตอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ควบคุมอัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และ พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.00

การเติบโต	μ ; h^{-1}	$Y_{x/s}$; cfu/g	$Y_{p/s}$; cfu*/g	Q_p ; cfu*/l.h	q_p ; cfu*/cfu.h
จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต	0.289	1.179×10^{10}	-	-	-
จำนวนสปอร์ทั้งหมด	-	-	1.022×10^{10}	0.353×10^{10}	0.024
ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 nm.	0.301	1.01	-	-	-

หมายเหตุ μ : อัตราการเติบโตจำเพาะ $Y_{x/s}$: ผลได้ของเซลล์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส
$Y_{p/s}$: ผลได้ของการสร้างสปอร์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส
Q_p : อัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมด q_p : อัตราจำเพาะของการสร้างสปอร์ทั้งหมด

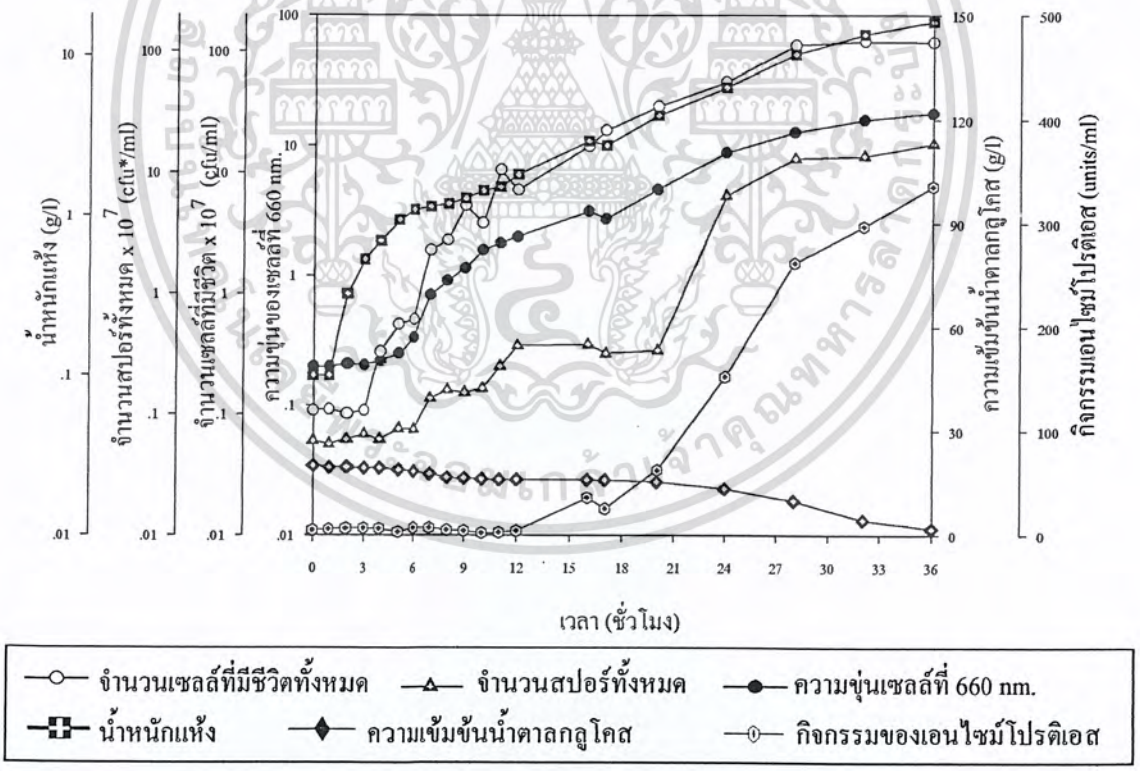
จากตารางที่ 5 พบว่าอัตราการเติบโตจำเพาะจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด และ ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตรเท่ากับ 0.289 และ 0.301 h^{-1} ตามลำดับ ผลได้ของเซลล์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส ($Y_{x/s}$) ของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด และ ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตรเท่ากับ 1.179×10^{10} cfu.g^{-1} glucose และ 1.01 l.g^{-1} glucose ตามลำดับ ผลได้ของการสร้างสปอร์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส ($Y_{p/s}$) จากจำนวนสปอร์ทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 1.022×10^{10} cfu*.g^{-1} glucose

กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส พบว่ามีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 64.76 units/ml ที่ชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงเหลือ 6.15 g/l ในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาการเติบโต การสร้างสปอร์ และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 โดยแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในถังหมัก ในช่วงการเริ่มต้นของการเติบโตคงที่ (stationary phase)

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในถังหมักที่ควบคุมความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในอาหารเพาะเลี้ยงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 0-16 เป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 17-36 ของการเพาะเลี้ยง ดังภาพที่ 8 จะเห็นได้ว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดได้เท่ากับ 1.22×10^9 cfu/ml ในชั่วโมงที่ 32 ของการเพาะเลี้ยง โดยการเจริญเติบโตจะเข้าสู่ช่วง exponential growth phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงและหลังจากชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 36 จะเป็นช่วง stationary phase โดยความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตรเท่ากับ 17.85 ในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งช่วงการเจริญเติบโตเป็นไปในทางเดียวกับการวัดการเติบโตโดยวิธีการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด



ภาพที่ 8 ผลการศึกษาการเติบโต การสร้างสปอร์ และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลายใน ถังหมัก 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงปรับเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเท่ากับ 7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 6 อัตราการเติบโตจำเพาะจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด และ ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตรเท่ากับ 0.500 และ 0.315 h^{-1} ตามลำดับ ผลได้ของเซลล์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส ($Y_{x/s}$) จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด และ ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 6.851×10^{10} cfu.g^{-1} glucose และ 1.063 l.g^{-1} glucose ในชั่วโมงที่ 17-36 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ ผลได้ของการสร้างสปอร์ทั้งหมดจากการใช้น้ำตาลกลูโคส ($Y_{p/s}$) มีค่าเท่ากับ 1.203×10^{10} cfu*.g^{-1} glucose ในชั่วโมงที่ 17-36 ของการเพาะเลี้ยง

สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของการเพาะเลี้ยงเชื้อที่สภาวะการแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนละลายเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 335.47 units/ml ในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงเหลือ 1.72 g/l ในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 พารามิเตอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในถังหมัก 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงปรับเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.00

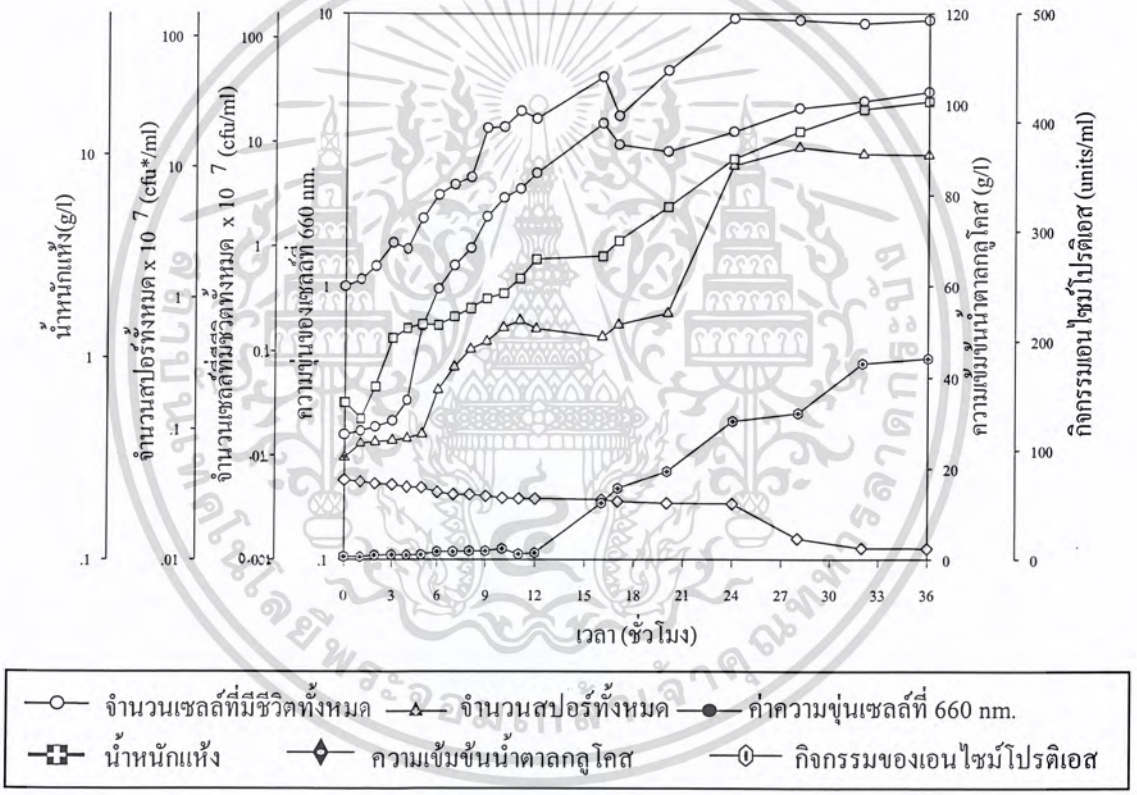
ชั่วโมง (h)	μ ; h^{-1}			อัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมด		$Y_{x/s}$; cfu/g			$Y_{p/s}$; cfu*/g
	ความขุ่นเซลล์ที่ 660 nm.	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต	น้ำหนักแห้ง	Q_p ;cfu*/l.h x 10^{10}	q_p; cfu*/cfu.h	ความขุ่นเซลล์ที่ 660 nm.	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (x 10^{10})	น้ำหนักแห้ง	จำนวนสปอร์ทั้งหมด (x 10^{10})
0-16	0.315	0.500	0.349	0.020	0.0012	0.722	4.095	0.704	0.079
17-36	0.1401	0.143	0.106	0.899	0.0518	1.063	6.851	0.958	1.203

สัญลักษณ์ μ : อัตราการเติบโตจำเพาะ $Y_{x/s}$: ผลได้ของเซลล์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส

$Y_{p/s}$: ผลได้ของการสร้างสปอร์จากการใช้จากการใช้น้ำตาลกลูโคส

Q_p : อัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมด q_p : อัตราจำเพาะของการสร้างสปอร์ทั้งหมด

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590ในถังหมักโดยแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนละลายจาก 100 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 0-16 เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 17-36 ของการเพาะเลี้ยง จากภาพที่ 9 จะเห็นได้ว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดเท่ากับ 1.50 x 10^9cfu/ml ในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง โดยการเจริญเติบโตจะเข้าสู่ช่วง exponential growth phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 5 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงและหลังจากชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 36 จะเป็นช่วง stationary phase โดยความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตรได้ เท่ากับ 5.14 ในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งช่วงการเจริญเติบโตเป็นไปในทางเดียวกับการวัดการเจริญเติบโตโดยวิธีการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด



ภาพที่ 9 ผลการศึกษาการเติบโต การสร้างสปอร์ และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ B. thuringiensis JC590 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในถังหมัก 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงปรับเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ และพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 พารามิเตอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในถังหมัก 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงปรับเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.00

ชั่วโมง (h)	μ ; h^{-1}			อัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมด		$Y_{x/s}$; cfu/g			$Y_{p/s}$; cfu*/g
	ความขุ่นเซลล์ที่ 660 nm.	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต	น้ำหนักแห้ง	Q_p ;cfu*/l.h x 10^{10}	q_p; cfu*/cfu.h	ความขุ่นเซลล์ที่ 660 nm.	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (x 10^{10})	น้ำหนักแห้ง	จำนวนสปอร์ทั้งหมด (x 10^{10})
0-16	0.307	0.478	0.364	0.028	0.0007	0.839	3.307	0.583	2.799
17-36	0.037	0.130	0.091	0.614	0.0048	0.176	1.22	1.385	1.115

สัญลักษณ์ μ : อัตราการเติบโตจำเพาะ $Y_{x/s}$: ผลได้ของเซลล์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส

$Y_{p/s}$: ผลได้ของการสร้างสปอร์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส

Q_p : อัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมด q_p : อัตราจำเพาะของการสร้างสปอร์ทั้งหมด

จากตารางที่ 7 พบว่าอัตราการเติบโตจำเพาะจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด และ ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตรเท่ากับ 0.478 และ 0.307 h^{-1} ตามลำดับ ผลได้ของเซลล์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส ($Y_{x/s}$) จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด และ ความขุ่นเซลล์ที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ $1.22x10^{10}$ cfu.g $glucose^{-1}$ และ 0.176 l.g $glucose^{-1}$ ในชั่วโมงที่ 17-36 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ ผลได้ของการสร้าง สปอร์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 1.115×10^{10} cfu*.g $glucose^{-1}$ ในชั่วโมงที่ 17-36 ของการเพาะเลี้ยง

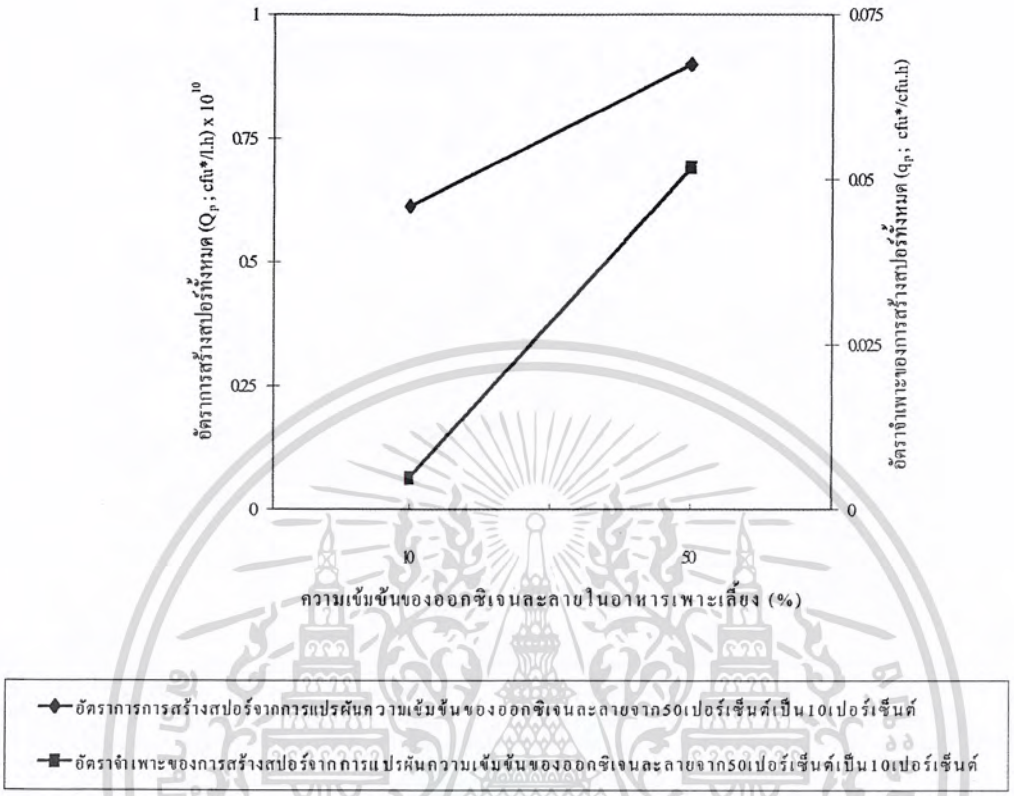
สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของการเพาะเลี้ยงเชื้อที่สภาวะการแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนละลายเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 148.26 units/ml ในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงเหลือ 2.35 g/l ในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะและอัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมดในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับถังหมักภายโดยแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในถังหมัก 2 ระดับภายหลังชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง

ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายหลังชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง (%)	อัตราการเติบโตจำเพาะ(h^{-1})			อัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมด	
	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ความขุ่นเซลล์ที่ 660nm.	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด	Q_p x 10^{10}(cfu*/l.h)	q_p (cfu*/cfu.h)
10	0.091	0.037	0.130	0.614	0.0048
50	0.141	0.140	0.143	0.899	0.0518

หมายเหตุ Q_p : อัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมด q_p : อัตราจำเพาะของการสร้างสปอร์ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่10 เปรียบเทียบอัตราการสร้างสปอร์จำเพาะและอัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมดในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับถังหมักโดยแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย ในถังหมัก 2 ระดับ ภายหลัง ชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง

พิจารณาถึงผลของความเข้มข้นของออกซิเจนละลายต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของการวัดความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตร และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด เมื่อแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนละลายเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้อัตราการเติบโตจำเพาะและอัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นด้วย แต่ในสภาวะที่มีการแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนละลายเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 17 ของการเพาะเลี้ยงจะสังเกตเห็นว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจะลดลงเล็กน้อย เนื่องจากเชื้อมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะใหม่ที่มีการลดความเข้มข้นของออกซิเจนละลายลง โดยที่เชื้อ *B. thuringiensis* มีคุณลักษณะสำคัญ คือ เป็น facultative anaerobe คือจะเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศเต็มที่ และในที่ที่มีอากาศเพียงเล็กน้อยเชื้อ *B. thuringiensis* ก็ยังสามารถเจริญได้แต่เจริญได้ไม่ดีเท่าที่ควร จึงเป็นเหตุให้ที่ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

50 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *B. thuringiensis* สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะใหม่และเจริญได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเติบโตจำเพาะที่วัดจากน้ำหนักเซลล์แห้ง และ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดในช่วงชั่วโมงที่ 17-36 ของการเพาะเลี้ยง ในสภาวะที่มีการแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนละลายเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 0.143 และ 0.106 h^{-1} และจะเห็นได้ว่ามีค่าสูงกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะของการแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนละลายที่ 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8) จากการรายงานของ Yang และ Wang (1998) ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. thuringiensis* โดยอ้างรายงานของ Chang ในปี 1993 พบว่าเมื่อควบคุมความเข้มข้นของออกซิเจนละลายโดยแปรผันความเข้มข้นเป็น 2.5 10.0 และ 30 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของออกซิเจนละลายที่ 2.5 เปอร์เซ็นต์ จะมีผลกระทบต่อความขุ่นของเซลล์มากที่สุด และ WU และคณะ (2002) ได้ศึกษาแรงเฉือนที่เกิดจากการกวนของใบพัดในถังหมัก พบว่าเมื่อทำการเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 1.5 เป็น 4.5 vvm ในช่วงของการเจริญแบบ stationary phase ก็จะทำให้การผลิตสาร thuringiensin สูงขึ้น และเมื่อเพิ่มความเร็วรอบของการกวนในระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์แบบ stationary phase การผลิตสาร thuringiensin จะต่ำลง

ส่วนอัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมด และ อัตราจำเพาะของการสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. thuringiensis* จะพบว่า เมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในถังหมักเพิ่มขึ้น อัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นตามด้วย ซึ่งมีการทดลองของ Avignone-Rossa และคณะ (1992) ได้ศึกษาการเจริญเติบโต การสร้างสปอร์ และ การผลิตเดลต้า-เอนโดท็อกซินของ *B. thuringiensis* ในการจำกัดและไม่จำกัดออกซิเจน พบว่าผลได้ของเซลล์ของการผลิตท็อกซินและจำนวนสปอร์ทั้งหมดของการทดลองการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* แบบไม่จำกัดออกซิเจน จะมีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบจำกัดออกซิเจน ในปี 1993 Bernhard และ UTZ ได้รายงานว่าภายใต้สภาวะที่ไม่มีการให้อากาศจะทำให้เชื้อ *B. thuringiensis* มีการเติบโตที่ช้าและการสร้างสปอร์อาจถูกยับยั้งได้ ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกับผลการทดลองของ Foda และคณะ (1985) ซึ่งได้ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *B. thuringiensis* พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสต่ออัตราการให้อากาศเป็น 1:19 จะทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและการเกิดสปอร์สูงขึ้นได้ Yang และ Wang (1998) ได้ศึกษาความขุ่นของเซลล์ของเชื้อ พบว่าถ้าต้องการให้เซลล์มีความขุ่นเพิ่มมากขึ้นจะต้องให้ออกซิเจน (oxygen tranfer rate)ในความเข้มข้นสูงและมีการรายงานของ Roth และคณะ (1954) ได้รายงานไว้ว่า *Bacillus anthracis* มีความต้องการออกซิเจนในการผลิตสปอร์เป็นอย่างยิ่ง ซึ่งผลของการให้อากาศมีความสัมพันธ์กับการเกิดของสปอร์แตกต่างจากระยะการเติบโตของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

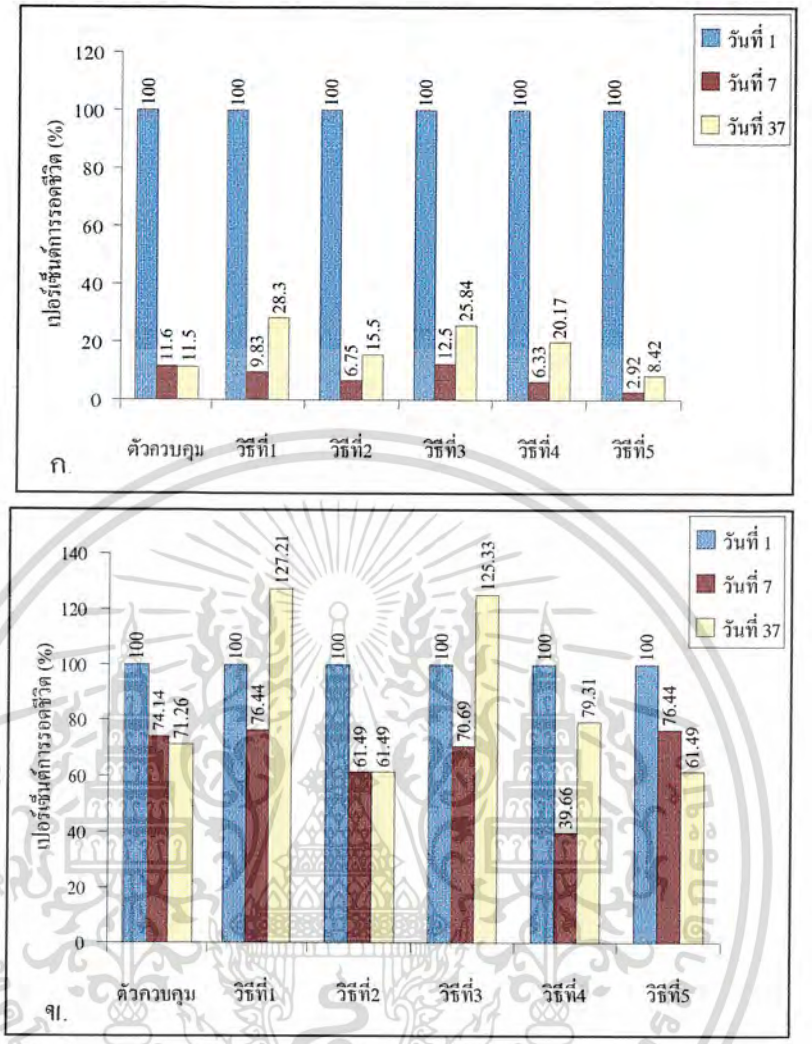
จากตารางที่ 8 จะทำให้ทราบว่าความเข้มข้นของออกซิเจนละลายมีผลต่อค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและอัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมดของเชื้อและจากตารางที่ 8 จะเห็นว่าที่ระดับความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในอาหารเพาะเลี้ยง 50 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้อัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าที่ 10 เปอร์เซ็นต์

ศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อ *B. thuringiensis* JC590

ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในถังหมักจนครบชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง จึงทำการรักษาเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 โดยใช้วิธีการต่างๆ เพื่อหาวิธีที่จะเก็บรักษาเชื้อให้มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด และ เปอร์เซ็นต์สปอร์ทั้งหมดในปริมาณที่สูง ซึ่งทำการศึกษาวิธีการการเก็บรักษาเชื้อทั้งหมด 6 วิธี แบ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 อุณหภูมิ คือ อุณหภูมิห้อง และ อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส และทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และ เปอร์เซ็นต์สปอร์ทั้งหมด ในวันที่ 1 7 และ 37 ตามลำดับ โดยกำหนดให้ปริมาณเซลล์ และ สปอร์ ณ วันที่ 1 ที่ทำการเก็บรักษาเชื้อ ในแต่ละวิธีคิดเทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

จากภาพที่ 11 พบว่า ที่อุณหภูมิห้องเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ และ เปอร์เซ็นต์ของสปอร์ทั้งหมดมีทิศทางเป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยที่เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ ทั้ง 5 วิธี และตัวควบคุม จะมีทิศทางลดลงอย่างรวดเร็วเหลือประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ที่ทำการเก็บรักษาเชื้อ และจะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงวันที่ 7 ถึงวันที่ 37 ที่ทำการเก็บรักษาเชื้อ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ของสปอร์ทั้งหมดโดยรวมแล้วจะมีทิศทางต่ำลงในช่วง 7 วันแรกที่ทำการเก็บรักษาเชื้อ และ จะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงวันที่ 7 ถึงวันที่ 37 ที่ทำการเก็บรักษาเชื้อ อาจเนื่องมาจากในช่วง 7 วันแรกเซลล์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ซึ่งไม่มีการให้อากาศ ทำให้เซลล์ลดจำนวนลง และเปลี่ยนสภาพไปอยู่ในรูปของสปอร์ โดยที่เซลล์บางส่วนอาจเกิดการแตกสลายไปก่อนที่จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของสปอร์ จึงทำให้ปริมาณของสปอร์ที่ได้ไม่สูงขึ้น และเมื่อทำการเก็บรักษาเชื้อต่อไปจนถึงวันที่ 37 ปริมาณสปอร์ที่ได้จะเพิ่มสูงขึ้น และสปอร์บางส่วนเกิดการงอกกลับไปเป็นตัวเซลล์ได้ใหม่ อีกทั้งเซลล์สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์สูงขึ้น ซึ่งวิธีการที่ 1 คือ การใช้น้ำมันพืช 5 มิลลิลิตร จะให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ และ เปอร์เซ็นต์ของสปอร์ทั้งหมด สูงกว่าวิธีอื่นๆที่ทำการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่11 การเก็บรักษาเชื้อ *B. thuringiensis* JC 590 ที่อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 1 7 และ 37 ตามลำดับ

ก. เซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด

ข. สปอร์ทั้งหมด

หมายเหตุ ตัวควบคุม: น้ำหมัก 10 มิลลิลิตร

วิธีที่ 1 : น้ำหมัก 5 มิลลิลิตร + น้ำมันพืช 5 มิลลิลิตร

วิธีที่ 2 : น้ำหมัก 7.5 มิลลิลิตร + น้ำมันพืช 2.5 มิลลิลิตร

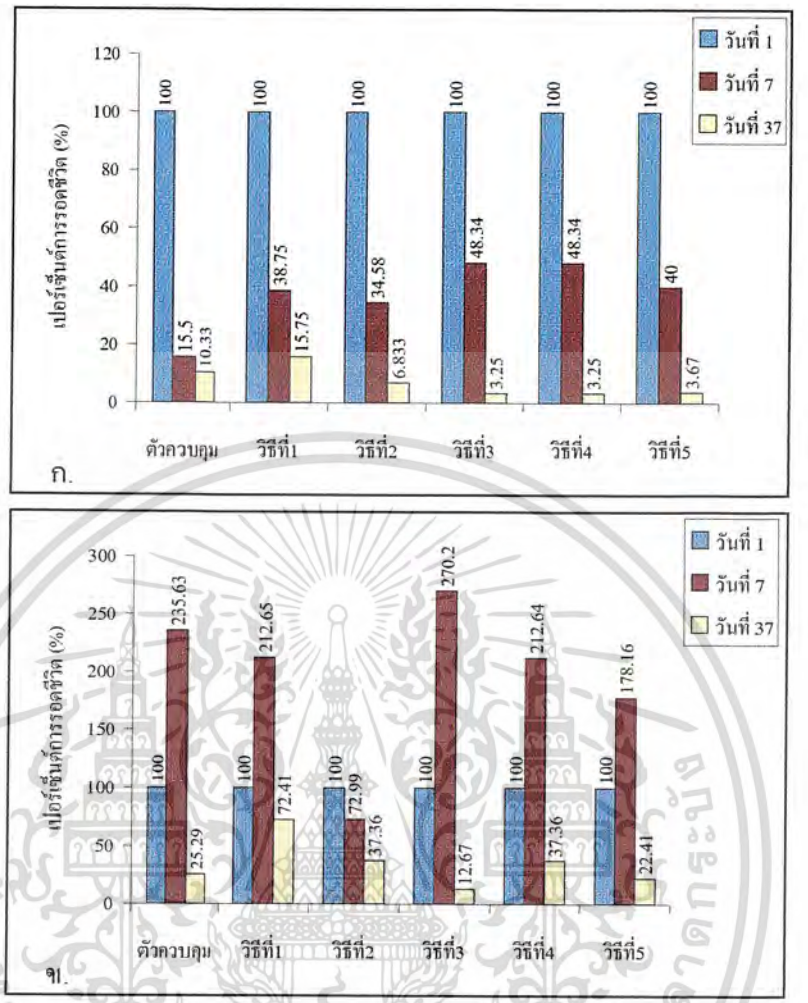
วิธีที่ 3 : น้ำหมัก 5 มิลลิลิตร + ไข่แดง 1 มิลลิลิตร + น้ำมันพืช 4 มิลลิลิตร

วิธีที่ 4 : น้ำหมัก 5 มิลลิลิตร + หางนมผง 3 มิลลิลิตร + น้ำมันพืช 7 มิลลิลิตร

วิธีที่ 5 : น้ำหมัก 5 มิลลิลิตร + (น้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์)10 มิลลิลิตร

โดยวิธีที่ 4 และ5ใช้น้ำหมักที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา10นาที แล้วเท ส่วนใสทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 12 การเก็บรักษาเชื้อ *B. thuringiensis* JC 590 ที่อุณหภูมิ-18 องศาเซลเซียสในวันที่ 1 7 และ 37 ตามลำดับ

ก. เซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด

ข. สปอร์ทั้งหมด

หมายเหตุ ตัวควบคุม: น้ำหมัก 10 มิลลิลิตร

วิธีที่ 1 : น้ำหมัก 5 มิลลิลิตร + น้ำมันพืช 5 มิลลิลิตร

วิธีที่ 2 : น้ำหมัก 7.5 มิลลิลิตร + น้ำมันพืช 2.5 มิลลิลิตร

วิธีที่ 3 : น้ำหมัก 5 มิลลิลิตร + ไข่แดง 1 มิลลิลิตร + น้ำมันพืช 4 มิลลิลิตร

วิธีที่ 4 : น้ำหมัก 5 มิลลิลิตร + หางนมผง 3 มิลลิลิตร + น้ำมันพืช 7 มิลลิลิตร

วิธีที่ 5 : น้ำหมัก 5 มิลลิลิตร + (น้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์)10 มิลลิลิตร

โดยวิธีที่ 4 และ5ใช้น้ำหมักที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา10นาที แล้วเท ส่วนใสทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 12 พบว่า ที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ และเปอร์เซ็นต์ของสปอร์ทั้งหมดมีทิศทางเป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยที่เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ ทั้ง 5 วิธี และตัวควบคุม มีทิศทางลดลงอย่างช้าๆเหลือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ที่ทำการเก็บรักษาเชื้อ และจะลดลงต่อไปในช่วงวันที่ 7 ถึงวันที่ 37 ที่ทำการเก็บรักษาเชื้อ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ของสปอร์ทั้งหมดโดยรวมแล้วจะมีทิศทางเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 7 วันแรกที่ทำการเก็บรักษาเชื้อ และ ลดต่ำลงในช่วงวันที่ 7 ถึงวันที่ 37 ที่ทำการเก็บรักษาเชื้อ อาจเนื่องมาจากในช่วง 7 วันแรกเซลล์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ซึ่งไม่มีการให้อากาศ และอุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. thuringiensis* ทำให้เซลล์ลดจำนวนลง และเปลี่ยนสภาพไปอยู่ในรูปของสปอร์ ทำให้เปอร์เซ็นต์ของสปอร์ทั้งหมดสูงขึ้นมาก และเมื่อทำการเก็บรักษาเชื้อต่อไปจนถึงวันที่ 37 ของการเก็บรักษาเชื้อ ปริมาณสปอร์ที่ได้จะลดต่ำลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อดังกล่าว เป็นอุณหภูมิที่ติดลบ ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง เข้าไปทำลายตัวเซลล์และสปอร์ได้ ทำให้ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต และ สปอร์ทั้งหมดลดลงซึ่งวิธีการที่ 1 คือ การใช้น้ำมันพืช 5 มิลลิลิตร จะให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ และเปอร์เซ็นต์ของสปอร์ทั้งหมดโดยรวมแล้วสูงกว่าวิธีอื่นๆที่ทำการทดลอง

จะเห็นได้ว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง และ อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส จะให้ผลในทิศทางเดียวกัน คือ การใช้น้ำมันพืชที่ 5 มิลลิลิตร จะให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ และ เปอร์เซ็นต์ของสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าวิธีอื่นๆ ซึ่งอาจเนื่องมาจากน้ำมันจะทำให้ออกซิเจนไม่สามารถผ่านลงไปในน้ำหมักได้ ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เพราะเชื้อ *B. thuringiensis* เป็นแบคทีเรียพวก facultative anaerobe และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ 2 ที่ใช้น้ำมันพืชเช่นกัน แต่ปริมาตรที่ใช้ 2.5 มิลลิลิตร จะพบว่าปริมาตรน้ำมันที่มากกว่าจะให้ผลการเก็บรักษาเชื้อที่ดีกว่า เนื่องจากความหนาของชั้นน้ำมันเหนือน้ำหมักยิ่งมาก จะทำให้ออกซิเจนผ่านลงไปได้ยากขึ้น เชื้อจะไม่สามารถใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* JC590 ในระดับฟลาสก์โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิที่ 2.5 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในน้ำอามิ-อามิความเข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุดเท่ากับ 5.0×10^8 cfu/ml ในชั่วโมงที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับอัตราการเติบโตจำเพาะจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด และ ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตรให้ค่าสูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ 0.269 และ 0.287 h^{-1} ตามลำดับ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ 10.0 เปอร์เซ็นต์ จะให้อัตราการเติบโตจำเพาะของเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 สูงสุด

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* ในระดับถังหมักสภาวะควบคุม โดยมีการกวนให้อากาศ 1,000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เชื้อ *B. thuringiensis* JC590 จะเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง ได้อัตราการเติบโตจำเพาะจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดเท่ากับ 0.289 h^{-1} อัตราการเติบโตจำเพาะจากความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.301 h^{-1} อัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมดของเชื้อ (Q_p) และ อัตราจำเพาะของการสร้างสปอร์ทั้งหมด (q_p) เท่ากับ 0.353×10^{10} cfu*/l.h และ 0.024 cfu*/cfu/h ตามลำดับ

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* ในระดับถังหมักภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์ จนถึงชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงปรับเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเติบโตจำเพาะจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด และ ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 และ 0.315 h^{-1} อัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมดของเชื้อ (Q_p) และ อัตราจำเพาะของการสร้างสปอร์ทั้งหมด (q_p) ที่ชั่วโมงที่ 17-36 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 0.899×10^{10} cfu*/l.h และ 0.0518 cfu*/cfu/h และภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์ จนถึงชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงปรับเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ได้อัตราการเติบโตจำเพาะจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และ ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.48 และ 0.307 h^{-1} อัตราการสร้างสปอร์ทั้งหมดของเชื้อ (Q_p) และอัตราจำเพาะของการสร้างสปอร์ทั้งหมด (q_p) ชั่วโมงที่ 17-36 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 0.614×10^{10} cfu*/l.h และ 0.0048 cfu*/cfu/h โดยสรุปว่าความเข้มข้นของออกซิเจนละลายเพิ่มขึ้นจะทำให้การเจริญเติบโตและการผลิตสปอร์ของเชื้อ *B. thuringiensis* เพิ่มขึ้นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการเก็บรักษาเชื้อเบื้องต้นสรุปได้ว่าวิธีการเก็บรักษาเชื้อโดยใช้น้ำมันพืช 5 มิลลิลิตร จะให้ผลของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ และ เปอร์เซ็นต์ของสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าวิธีอื่นๆ โดยเฉพาะการเก็บที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส จะให้ผลการเก็บรักษาที่ดีกว่าการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิห้อง แต่ยังต้องมีการศึกษาค้นคว้าครั้งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จริยา จันทร์ไพแสง และ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ สมศักดิ์ ศิวิชัย. 2541. จุลินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืช. **เอกสารประกอบนิทรรศการ งานเกษตรแฟร์ ระหว่างวันที่ 31 มกราคม – 7 กุมภาพันธ์ 2541 ณ มหาวิทยาศาสตร์** , กรุงเทพฯ. 19 น.

เจือจันทน์ จันทสุบรรณ. 2530. เอ็นโดสปอร์ในแบคทีเรีย. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21 (2)** : 41-44.

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2535. **โรควิทยาของแมลง.** ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน , นครปฐม. 205 น.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2535. **จุลชีววิทยา เล่ม 1.** บ. โอเอสพริ้นท์ติ้งเฮาส์ จำกัด , กรุงเทพฯ. 357 น.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. ม.ป.ป. **บทปฏิบัติการวิชาวิศวกรรมชีวเคมี (051334).** ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 65 น.

สุรัตน์ รวยอารีย์, บุษราคัม อุดมศักดิ์, ประสาน วงศาโรจน์. 2542. **การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (IPM) ประเทศไทยในอดีต ปัจจุบันและอนาคต.** น.ส.พ.กสิกร ปีที่ 72 ฉบับที่ 6 พฤศจิกายน-ธันวาคม 2542

วราวุฒิ ครูส่ง. 2535. **เทคโนโลยีชีวภาพ.** โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 163 น.

อัจฉรา ตันติโชดก. ม.ป.ป. **การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย.** กลุ่มงานวิจัยปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 23 น.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2534. แบคทีเรียควบคุมแมลงศัตรูพืช. **เอกสารวิชาการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.** ISBN 974-7620-90-1 : 148-166

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัจฉรา ตันติโชดก. 2535. **แบคทีเรียควบคุมแมลงศัตรูพืช.** เคหะการเกษตร 16 : 90-94.

Aizawa, K., Fujiyoshi, N., Ohba, M. and Yoshikawa, N. 1975. **Selection and Utilization of *Bacillus thuringiensis* Strains for Microbial Control.** Proc. 1 st International Congr. IAMS.Tokyo, 1974. Vol. 2 : 579-606.

Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. **J. Gen Physiol. 22** : 79-89.

Avignone-Rossa, C., J. Arcas and C. Mingnone. 1992. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ - endotoxin production in oxygen limited and non – limited cultures. **World J. Microbiol. and Biotechnol.** 8 : 301-304.

Bajwa, I.W. and Kogan, M. 2001. ***Bacillus thuringiensis* - Based Biological Control of Insect Pests.** Integrated Plant Protection Center (IPPC) Oregon State University, Corvallis, 4 p.

Barjac, H. de . 1981. **Identification of H-Serotypes of *Bacillus thuringiensis*** . Microbial Control of Pests and Plant Disease. (1970-1980) Academic Press : 7-34.

Barjac, H. de and Frachon, E. 1990. **Classification of *Bacillus thuringiensis* Strains**, pp.233-240.ใน อัจฉรา ตันติโชดก(ผู้รวบรวม). **แบคทีเรียควบคุมแมลงศัตรูพืช.** กรมวิชาการเกษตร , กรุงเทพฯ.

Bernhard, K. and UTZ, R. 1993. **Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial use.** *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide : 255-261.

Bulla, Jr., L.A., Bechtel, D.B., Kramer, K.J., Shethna, Y.L., Aronson, A.L. and Fitz-James, P.C. 1980. Ultrastructure, physiology and Biochemistry of *Bacillus thuringiensis* subp. *kurstaki*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 9 : 1123-1130.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bulla, L.A., G.S. Julian, R.A. Rhodes and C.W. Hesseltine. 1970. Physiology of spore forming bacteria associated with insects. I. Glucose catabolism in vegetative cells. **Can. J. Microbiol. 16** : 223-248.

Burges,H.D. and N.W. Hussey. 1971. **Microbial Control of Insects and Mites.** Academic Press, London. 861 p.

Cantwell, G.E., Dougherty, E., Cantelo, W.W. 1983. **Activity of β - exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* against the Colorado potato beetle and the Ames test, Environ. Entomol. 12** : 1424-1427.

Carroll, J., Ellar, D.J. and Li, J. 1991. **Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5A resolution.** Nature, 353: 815-821.

Ejiofor, A.O. and N. Okafor. 1989. Production of mosquito larvicidal *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 on row material media a from Nigeria. **J. App. Bacterio. 67** : 5-9.

Entwistle, P.E., J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs. 1993. ***Bacillus thuringiensis* An Environmental Biopesticide: Thory and Practice.** John Wiley & Sons Ltd., Chichester. 311 p.

Foda, M.S., H.S. Salama and M. selim. 1985. **Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 22 : 50-52.

Huang, T.K.,Wang, P.M. and Wu, W.T. 2001. Cultivation of *Bacillus thuringiensis* in an airlift reactor with wire mesh draft tubes. **Biochem Eng J 7** : 35-39.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hussey, N.W. and T.W. Tinsley. 1981. Impressions of insect pathology in the People's Republic of China, pp. 785-795. In H.D. Burges (ed.). **Microbial Control of Pest and Plant Disease.** Academic Press, London.

Jong, J.Z. 1994. **Application of an airlift reactor with a net draft tube in production of thuringiensin, Ph.D. thesis,** Tsiun Hua University, Hsinchu, Taiwan.

Jong, J.Z., Hsiun, D.Y.,Wu, W.T. 1995. **Fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* for thuringiensin production in a tower type reactor.** Biotechnol Bioeng 48 : 207-213.

Kang,B.C., S.Y. Lee and H.N. Chang. 1993. **Production of *Bacillus thuringiensis* spores in total cell retention culture and two-stage continuous culture using an internal ceramic filter system.** Biotech Bioeng. 42 : 1107-1112.

Lisansky, S.G., Quinlan, R. and Tassoni, G. 1993. **The *Bacillus thuringiensis* production** handbook. Laboratory methods, manufacturing, formulation, quality control, registration. CPL Scientific Limited.

Moscardi, F. 1988. Production and use entomopathogens, pp. 18-21. In D.W. Roberts and R.R. Granados (eds.). Brazil' Biotech. **Biological Pesticides and Novel Plant Pest-Resistance for Insect Pest Management.** Proceedings of a conference, July 18-20. Insect Pathology Resource Center, Boyce Thompson Institute for Plant Resource, Cornell University, Ithaca, USA.

Mummigatti, S.G. and A.N. Raghunathan. 1990. Influence of media composition on the production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. **J. Invertebr Pathol. 55** : 147-151.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nelson, N. 1944. A photometer adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.** 153 : 375-380.

Nickerson, K.W., J.D. Pinto and L.A. Bulla. 1974. Sporulation of *Bacillus thuringiensis* without concurrent derepression of the tricarboxylic acid cycle. **J. Biol 117(1)** : 321-323.

Nickerson, K.W. and L.A. Bulla. 1974. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects : minimal nutritional requirements of growth sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. App. Microbiol 47 (4) : 863-867.

Roth, N.G., Lively, D.V. and Hodge, H.M. 1954. **Influence of oxygen update and age of culture on sporulation of *Bacillus anthracis* and *Bacillus globig* II.** Appl Microbiol Biotechnol. 22 : 50-52..

Pearson, D. and O.P. Ward. 1988. **Effect of conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of protein crystal endotoxin.** Biotechnol Lett 10(7) : 451-456.

Poinar, G.O., Jr. and G.M. Thomas. 1978. **Diagnostic Manual of Identification of insect Pathogens.** Plenum Press, New York. 218 p.

Selinger, L.B., P.S.S. Dawson and G.G. Khachatourians. 1988. **Behaviour of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* under continuous phased cultivation in a cyclone fermentor.** App. Microbiol Biotechnol 28 : 247-253.

Singer, S. and M.H. Rogoff. 1968. Inhibition of growth of *Bacillus thuringiensis* by amino acids in defined media. **J. Invertebr Pathol 12** : 98-104.

Somogyi, M. 1952. Note on sugar determination. **J. Biol. Chem. 195** : 19-23.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vandenberg, J.D. and Shimanuki, H. 1986. **Two commercial preparations of the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* influence the mortality of caged adult honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae).** Environ. Entomol. 15: 166-169.

WU. W.-T. Hsu. Y.-L. Ko.Y.-F. and Yao.L.-L. b 2002. **Efecct of shear stress on cultivaion of *Bacillus thuringiensis* for thuringiensin prodiuction.** Appl microbiol Biotechnol. 58 : 175-177.

Yang, X.-M. and Wang, S.S. 1998. **Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective.** Biotechnol. Appl. Biochem. 28: 95-98.

Yamamoto, T. and G.K. Powell. 1993. ***Bacillus thuringiensis* crystal proteins : Recent advances in understanding its insecticidal activity,** pp. 1-41. In L. Kim (ed.). Advanced Engineer Pesticides. Marcel Dekker, New York.

Yoon, K.H., M.D. Han and H.S. Yu. 1987. Production of the spore-crystal complex by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* with some natural media. **Korean J. Entomol 17(4)** : 237-243.

http://www. Fao.org/docrep/t0533e/t0533e04.htm#2.2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหาร

Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
พีเอช	7	(ปรับพีเอชด้วย 0.1 N NaOH หรือ 0.1 N H_3PO_4)

Nutrient Agar (NA)

Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
พีเอช	7	(ปรับพีเอชด้วย 0.1 N NaOH หรือ 0.1 N H_3PO_4)

อาหารบีเอกซ์

น้ำอามิ-อามิ	2.5 5.0 และ 10.0	ปริมาตรต่อปริมาตร ตามลำดับ
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัมต่อลิตร
พีเอช	7	(ปรับพีเอชด้วย 0.1 N NaOH หรือ 0.1 N H_3PO_4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของน้ำอามิ-อามิ

กรดอะมิโน	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
aspartic acid	0.057
threonine	0.101
serine	0.044
glutamic acid	2.355
proline	0.327
glycine	0.073
alanine	0.372
valine	0.038
isoleucine	0.014
leucine	0.014
phenylalanine	0.028
lysine	0.088
arginine	-
tatal amino acid	3.511

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. วิธีการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหาร

วิธีการตรวจนับจุลินทรีย์บนอาหารวุ้นแข็ง (total count) เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจนับแบคทีเรียในอาหารชนิดต่างๆ ในการทดลองดังกล่าวนี้ให้ถือว่าจุลินทรีย์ที่ขึ้นบนอาหารวุ้นแข็ง เป็น เซลล์ (vegetative cell) ของเชื้อ *B. thuringiensis* JC590

วิธีการ

1. เจือจางตัวอย่างน้ำหมักในน้ำกลั่นให้ได้ความเจือจางตามที่ต้องการ (10^{-3}-10^{-8}) 3 ระดับความเจือจางขึ้นกับปริมาณเซลล์ในแต่ละชั่วโมงที่ทำการเก็บตัวอย่าง

2. ดูดอาหารแต่ละความเจือจาง ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) ที่แข็งตัวแล้ว

3. ทำการ spread plate ให้ทั่ว จนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง แล้วจึงปิดฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อและทำการคว่ำจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ

4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. ทำการนับจำนวนโคโลนีเดี่ยวๆที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปคำนวณเป็นจำนวนโคโลนี ต่อน้ำหมัก 1 มิลลิลิตร (cfu/ml) หาค่าเฉลี่ยจากระดับความเจือจางที่ให้จำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 –300 โคโลนี ต่อ จานเพาะเลี้ยงเชื้อ

คำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ลิตร) = จำนวนโคโลนีต่อจานเพาะเลี้ยงเชื้อ x dilution factor x 10,000

2. วิธีการตรวจนับจำนวนสปอร์ทั้งหมดในอาหาร

1. ดูดตัวอย่างน้ำหมัก 1 มิลลิลิตร นำไปวางไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 80 องเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลาย vegetative cell และ ทำให้เซลล์ของเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 แตกออกจะได้สปอร์ออกมา จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างน้ำหมักในน้ำกลั่นให้ได้ความเจือจางตามที่ต้องการ (10^{-3}-10^{-8}) 3 ระดับความเจือจางขึ้นกับปริมาณสปอร์ในแต่ละชั่วโมงที่ทำการเก็บตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ดูดอาหารแต่ละความเจือจาง ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) ที่แข็งตัวแล้ว

3. ทำการ spread plate ให้ทั่ว จนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง แล้วจึงปิดฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อ และทำการคว่ำจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ

4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. ทำการนับจำนวนโคโลนีเดี่ยวๆที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปคำนวณเป็นจำนวนโคโลนี ต่อน้ำหนัก 1 มิลลิลิตร (cfu*/ml) หาค่าเฉลี่ยจากระดับความเจือจางที่ให้จำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 –300 โคโลนี ต่อ จานเพาะเลี้ยงเชื้อ

<u>คำนวณจำนวนสปอร์ที่นับได้</u>

จำนวนสปอร์ (สปอร์/ลิตร) = จำนวนโคโลนีต่อจานเพาะเลี้ยงเชื้อ x dilution factor x 10,000

<u>3. วิธีการวัดค่าความขุ่นของเซลล์</u>

1. ทำการเตรียม blank โดยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ เช่น ที่ 2-20 เท่า เปรียบเทียบโดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank เป็นต้น

2. นำตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เหมาะสมก่อนนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

3. ทำการเจือจางน้ำหมักที่ความเข้มข้นต่างๆ ให้ค่าการดูดกลืนที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 0.2-0.8 เช่น การเจือจางที่ 10 เท่า หมายความว่า ให้ใช้น้ำหมัก 1 มิลลิลิตรแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นอีก 9 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน คือ 1:9 เป็น 10 เท่า เป็นต้น

4. บันทึกผลค่าความขุ่นที่วัดได้ทุกชั่วโมงที่ทำการตรวจสอบ

5. นำผลที่ได้ไปทำการเขียนกราฟเปรียบเทียบกับเวลา

<u>4. วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง</u>

1. เตรียม Appendorf ที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน 2 หลอด

2. ดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Appendorf

3. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที รินส่วนใสเก็บไว้เพื่อใช้วิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ และ กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

4. เติมน้ำกลั่น หรือ น้ำเกลือ (0.9 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์) 1 มิลลิลิตร ลงใน Appendorf นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง

5. รินส่วนใสทิ้งนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ทิ้งให้เย็นในโถทำแห้ง (desicator) และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

<u>คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง</u>

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) = $\frac{(A + B) - A \times 10^3}{C}$

โดยที่ A : น้ำหนักหลอดทดลองและเซลล์แห้ง (กรัม)

B : น้ำหนักหลอดทดลอง (กรัม)

C : ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

วัดได้จากเอนไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโน และ ทำการหาปริมาณกรดอะมิโนดังกล่าวโดยใช้สารเคมีโฟลิน (folin reagent) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร โดยทั่วไปชนิดของโปรตีนที่ใช้เป็นสับสเตรต คือ เคซีน ซึ่งเหมาะสำหรับสภาพที่เป็นด่าง ปริมาณไทโรซีน (tyrosine) ที่วัดได้จากการที่เอนไซม์ย่อยโปรตีนจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณกรดอะมิโน และเปปไทด์ที่ละลายน้ำ (water soluble) ที่ถูกย่อยออกมา การหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร จะใช้วิธีการวิเคราะห์โดยดัดแปลงวิธีการของ Anson (1938)

สารเคมี

1. สารละลายเคซีนเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งเคซีน 1.2 กรัมใน 0.05 M phosphate buffer พีเอช 7.0 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปต้มและคนจนละลาย รอจนกว่าสารละลายเคซีนจะเย็นลง จานั้นปรับปริมาตรของสารละลายจนเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย 0.05 M phosphate buffer พีเอช 7.0 ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร

2. Trichloroacetic acid solution (TCA) 0.44 M เป็นสารละลายที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน ซึ่ง Trichloroacetic acid 78.92 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3. 1 M Folin-ciocalteu reagent ผสมในน้ำกลั่น อัตราส่วน 1 : 2 เตรียมก่อนใช้

4. 0.05 M phosphate buffer พีเอช 7.0 เตรียมโดย ผสมสารละลาย A กับ B แล้วปรับพีเอชให้ได้ 7.0

สารละลาย A : M/20 $Na_2HPO_4.12H_2O$ โดยใช้ 8.95 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

สารละลาย B : M/20 KH_2PO_4 โดยใช้ 3.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

5. 0.55 M Na_2CO_3 ซึ่งเตรียมโดย ชั่ง Na_2CO_3 58.3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. ใส่สารละลายเคซีน 1.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

2. เติมสารละลายเอนไซม์ตัวอย่างที่เจือจางแล้วด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมลงไป 1 มิลลิลิตร จับเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3. หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย TCA 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนจนสมบูรณ์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

4. กรองตะกอนโปรตีนออกโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

5. นำส่วนใสที่กรองไว้ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบเติม Na_2CO_3 5มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

6. เติม 1 N Folin-ciocateu reagent 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สีชัดเจน

7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ปรับค่า blank โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนสารละลายตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน

<u>การทำกราฟมาตรฐานไทโรซีน</u>

เตรียมสารละลายมาตรฐานไทโรซีนความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งไทโรซีนด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียดให้ได้ปริมาณ 0.01 กรัม เติม HCl เข้มข้น 2-3 หยด แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร นำสารละลายนี้มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของไทโรซีนเท่ากับ 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำสารนี้มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 5 – 7 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับจำนวนไมโครกรัมของไทโรซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเป็นหน่วยเอนไซม์

1 หน่วยของโปรติเอส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยเคซีนให้ได้ไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 10 นาที ในสภาวะของการวิเคราะห์

หน่วยของเอนไซม์โปรติเอสต่อมิลลิลิตร (units/ml) = $\frac{(E-E_0) \times b \times c}{E_s \times a \times t}$

โดยที่ E = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ที่วัดได้เมื่อให้เอนไซม์ย่อยสารตั้งต้นเคซีนเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศเซลเซียส

E_0 = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ที่วัดได้เมื่อหยุดกิจกรรมในการย่อยของเอนไซม์ก่อนที่จะเติมสารตั้งต้นเคซีน

E_s = ค่าคงที่ที่ได้จากค่าความชันของกราฟมาตรฐานไทโรซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

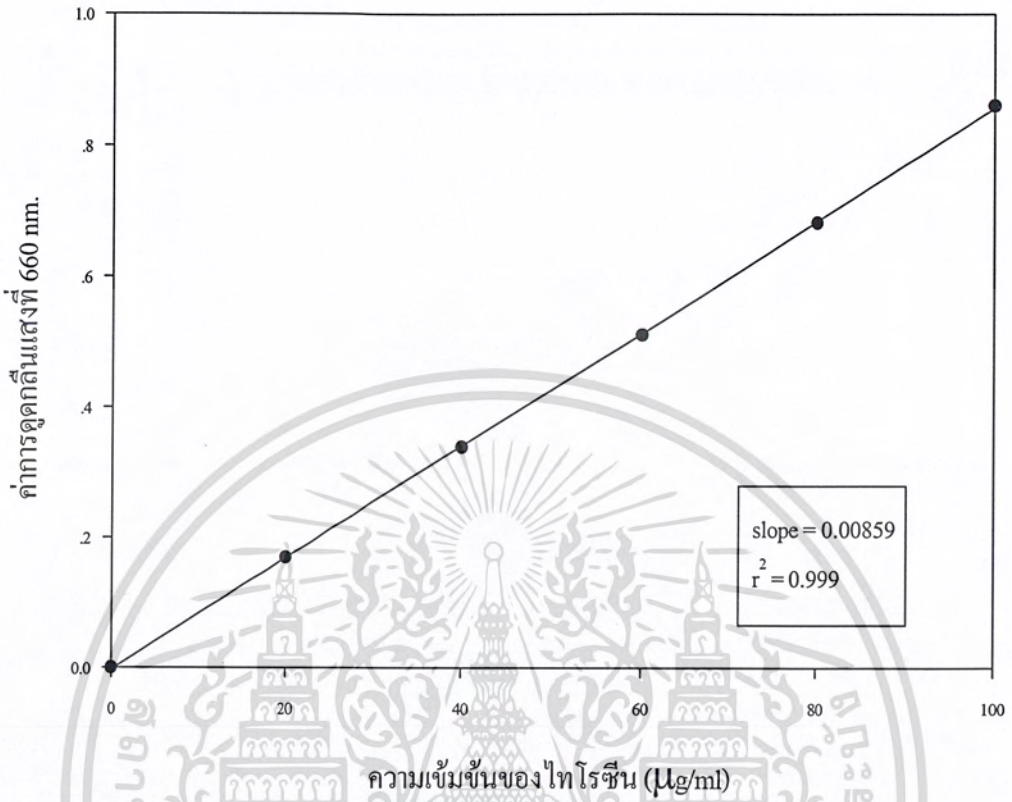
a =ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซึ่งใช้คราวละ 1.0 มิลลิลิตร

b =ปริมาตรของสารละลายทั้งหมดก่อนไปทำปฏิกิริยาให้เกิดสี คือ ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ สารละลายเคซีน และสารละลายที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน (TCA) รวมกัน ในที่นี้ใช้ปริมาตรรวมเท่ากับ 11 มิลลิลิตร

c = จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น

t = เวลาที่เอนไซม์ทำการย่อยสารตั้งต้นเคซีน ในที่นี้ใช้เวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 1 กราฟไทโรซีนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1944 ; Somogyi, 1952)

การเตรียมสารละลาย

สารละลาย Copper reagent

1. 10 เปอร์เซ็นต์ $CuSO_4.5H_2O$ 100 มิลลิลิตร (10 กรัมต่อ100 มิลลิลิตร)

2. Phosphate-tartate solution เตรียมโดยละลาย Na_2HPO_4 28 กรัม (หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 70.5495 กรัม) ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม Sodium potassium tartate (Tetrahydrate) 40 กรัม ทำให้ละลาย แล้วเติม 1 N NaOH 100 มิลลิลิตร ตามด้วย Na_2SO_4 (Anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองออกด้วยกระดาษ Whatman No.4

3. ผสมสารละลายในข้อ 1 และข้อ 2 เข้าด้วยกัน

Nelson's Arsenomolybdate color reagent ประกอบด้วย

1. สารละลาย Ammoniummolybdate $[(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O]$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. Disodium arsenate ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

3. ผสมสารละลายในข้อ 1 และข้อ 2 เข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และควรเก็บในขวดสีชา

วิธีการ

1. เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมคอปเปอร์รีเอเจนต์ (Copper reagent) 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ควรใช้ลูกแก้วปิดปากหลอดทดลองเพื่อลดการระเหยของน้ำ

2. ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ เติมอาร์เซโนโมลิบเดต รีเอเจนต์ (Arsenomolybdate reagent) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที สารละลายจะเป็นสีเขียว หรือ สีน้ำเงินขึ้นกับปริมาณน้ำตาล

3. เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

4. นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

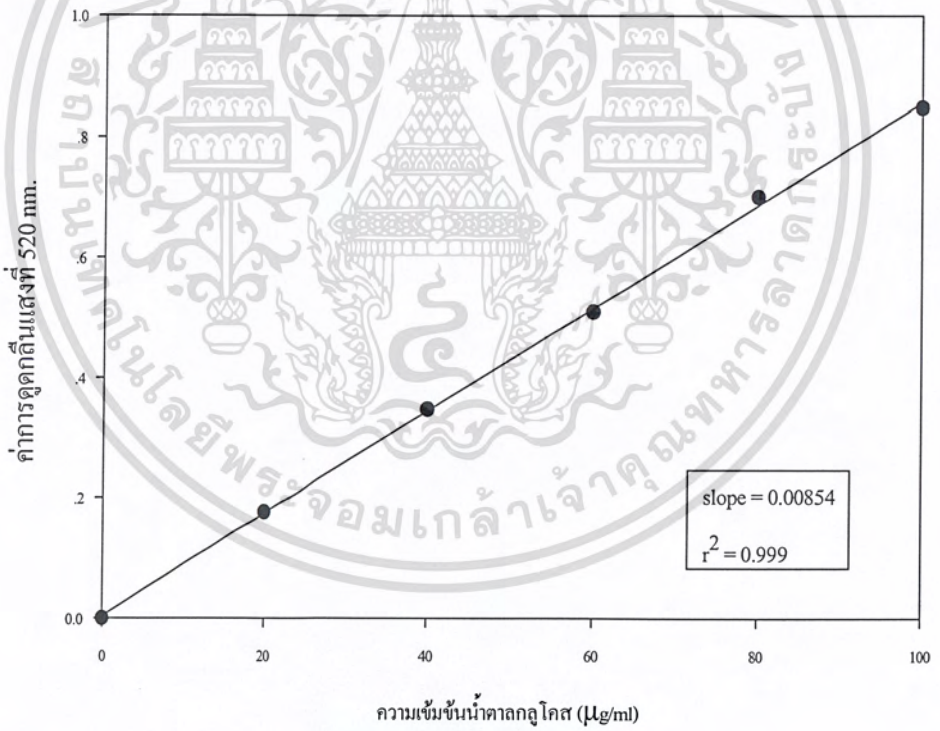
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำกราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 20 , 40 , 60 , 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแทนตัวอย่าง จากนั้นทำการวิเคราะห์ตามข้อ 1-3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรที่ได้และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐานกลูโคส

การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ความเข้มข้นของกลูโคส(กรัมต่อลิตร)= (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร) x (อัตราการเจือจาง)
(ความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน) x (1,000)



ภาพผนวกที่ 2 กราฟกลูโคสมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลการทดลอง

ตารางผนวกที่ 2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ ต่อการเติบโตของเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับฟลาสก์ ที่ 2.5 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ชั่วโมง	ผลการทดลองในแต่ละระดับความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ (%)														
	พีเอช			ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 nm.			จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต x 10^7 (cfu/ml)			ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (g/l)			กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)		
	2.5	5.0	10.0	2.5	5.0	10.0	2.5	5.0	10.0	2.5	5.0	10.0	2.5	5.0	10.0
0	6.64	6.53	6.12	0.28	0.26	0.24	1.47	1.69	1.40	17.8	18.0	18.7	1.60	1.12	1.44
2	6.20	6.25	6.20	0.44	0.43	0.33	1.97	1.83	1.50	16.8	17.7	18.5	4.56	3.52	3.76
4	5.90	5.65	5.60	0.76	0.88	0.87	1.91	2.87	3.42	16.5	16.7	17.0	6.80	4.16	5.12
6	6.20	5.68	5.58	1.12	1.31	1.41	3.20	3.40	4.58	16.4	16.5	16.7	8.65	8.49	7.52
8	6.25	5.9	5.7	1.51	1.74	1.87	3.80	4.90	5.60	16.6	16.5	16.5	14.9	17.9	9.61
10	6.10	5.85	5.75	2.00	2.10	2.29	7.28	11.3	13.6	16.4	16.2	16.6	19.2	21.1	13.4
12	6.35	5.99	5.92	2.50	2.47	2.52	10.5	13.2	29.5	15.9	15.7	16.4	44.2	28.8	15.3
16	6.93	6.18	6.25	3.79	4.12	3.50	13.9	19.3	40.5	14.7	15.1	16.4	49.9	40.8	16.8
20	7.00	6.20	6.00	4.67	5.32	4.93	11.5	24.6	50.5	13.8	13.9	15.7	52.0	43.2	25.6
24	7.20	6.25	5.75	5.45	6.15	6.60	19.4	25.9	30.8	13.0	13.1	14.7	55.2	46.0	30.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3 ผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร ที่ควบคุมอัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.0

ชั่วโมง	ความเข้มข้นของออกซิเจนในอาหารเพาะเลี้ยง (%)	ความขุ่นเซลล์ที่ 660 nm.	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต x 10^7 (cfu/ml)	จำนวนสปอร์ทั้งหมด x 10^7 (cfu/ml)	ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (g/l)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)
0	100.80	0.35	0.12	0.11	18.57	4.30
1	100.30	0.32	0.13	0.13	17.77	4.43
2	100.00	0.31	0.13	0.12	17.53	4.63
3	99.90	0.31	0.14	0.16	17.37	4.82
4	99.50	0.31	0.43	0.22	16.96	5.08
5	96.80	0.33	0.48	0.30	16.36	5.65
6	99.50	0.34	0.62	0.22	15.65	6.23
7	99.90	0.40	0.92	0.24	14.65	7.45
8	98.70	0.77	0.92	0.35	14.48	7.77
9	95.20	1.01	1.25	0.20	13.77	8.16
10	94.20	1.33	1.56	0.35	13.40	9.44
11	94.40	1.57	1.92	0.37	13.34	9.83
12	97.20	1.88	2.33	0.36	13.02	9.57
16	87.30	2.57	4.47	0.53	12.84	27.24
20	87.90	3.61	7.27	1.75	12.69	31.22
24	85.80	6.35	10.30	6.70	12.49	37.13
28	68.30	10.47	11.25	11.00	11.11	45.49
32	84.30	13.63	15.40	18.40	8.75	47.03
36	90.00	14.03	14.76	12.80	6.15	64.76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 4 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในถังหมัก ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง ปรับเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชของอาหารเท่ากับ 7.0

ชั่วโมง	ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 nm.	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต x 10^7 (cfu/ml)	จำนวนสปอร์ทั้งหมด x 10^7 (cfu/ml)	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (g/l)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)
0	0.20	0.11	0.06	0.10	20.03	4.63
1	0.20	0.11	0.06	0.10	19.47	5.53
2	0.21	0.10	0.06	0.33	19.59	6.30
3	0.20	0.11	0.07	0.54	19.32	6.68
4	0.22	0.33	0.06	0.70	19.35	6.17
5	0.25	0.56	0.08	0.95	18.88	3.02
6	0.33	0.61	0.08	1.10	18.36	6.75
7	0.71	2.29	0.14	1.15	17.66	6.87
8	0.91	2.80	0.16	1.20	16.61	4.95
9	1.15	5.40	0.15	1.30	16.47	4.18
10	1.58	3.86	0.16	1.45	16.21	2.12
11	1.79	10.70	0.25	1.53	16.07	2.51
12	2.00	7.25	0.37	1.83	16.04	4.11
16	3.14	16.80	0.38	2.97	15.95	35.98
17	2.76	22.70	0.32	2.80	15.92	25.31
20	4.65	36.00	0.34	4.30	15.34	62.45
24	8.89	57.00	6.50	6.43	13.40	152.45
28	12.75	113.68	13.20	10.30	9.87	262.12
32	15.82	122.00	13.80	13.70	4.27	297.20
36	17.86	120.00	17.40	16.40	1.71	335.75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 5 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590ในถังหมัก ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง ปรับเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ พีเอชของอาหารเท่ากับ 7.0

ชั่วโมง	ความขุ่นของเซลล์ที่ 660 nm.	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต x 10^7 (cfu/ml)	จำนวนสปอร์ทั้งหมด x 10^7 (cfu/ml)	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (g/l)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)
0	0.29	0.41	0.06	0.60	17.58	2.63
1	0.30	0.48	0.08	0.50	17.17	2.18
2	0.31	0.64	0.08	0.72	16.75	3.92
3	0.32	1.08	0.08	1.25	16.57	4.24
4	0.38	0.94	0.09	1.40	16.02	4.05
5	0.72	1.86	0.09	1.47	15.91	4.56
6	0.98	3.11	0.20	1.45	14.90	7.26
7	1.19	3.90	0.30	1.60	14.40	7.32
8	1.38	4.60	0.41	1.75	14.38	7.77
9	1.80	13.60	0.47	1.95	14.05	7.84
10	2.11	13.90	0.60	2.07	13.59	9.83
11	2.28	19.80	0.68	2.45	13.46	5.08
12	2.60	16.74	0.59	3.05	13.41	5.97
16	3.96	42.00	0.51	3.15	13.21	52.04
17	3.30	17.70	0.63	3.75	12.82	65.53
20	3.11	48.00	0.77	5.50	12.41	80.69
24	3.67	150.00	10.20	9.50	12.22	126.82
28	4.48	145.00	14.10	13.00	4.59	134.14
32	4.75	135.00	12.50	16.70	2.44	179.63
36	5.14	145.00	12.30	18.25	2.35	184.26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 6 ผลของวิธีการเก็บรักษาเชื้อ *B. thuiringiensis* JC590 ที่อุณหภูมิห้อง และ อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ในวันที่ 1 7 และ 37 ตามลำดับ

วิธีการ	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต x10^{10} (cfu/ml)						จำนวนสปอร์ทั้งหมด x10^{10} (cfu/ml)					
	อุณหภูมิห้อง			อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส			อุณหภูมิห้อง			อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส		
	วันที่						วันที่					
	1	7	37	1	7	37	1	7	37	1	7	37
Control	1.2	0.14	0.13	1.2	0.18	0.12	0.17	0.12	0.12	0.17	0.41	0.04
วิธีที่ 1	0.6	0.05	0.14	0.6	0.23	0.09	0.08	0.06	0.14	0.08	0.18	0.06
วิธีที่ 2	0.9	0.06	0.14	0.9	0.31	0.06	0.13	0.10	0.08	0.13	0.09	0.04
วิธีที่ 3	0.08	0.01	0.02	0.08	0.04	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.02
วิธีที่ 4	0.33	0.02	0.06	0.3	0.15	0.44	0.04	0.02	0.03	0.04	0.10	0.01
วิธีที่ 5	0.30	0.001	0.003	0.03	0.01	0.001	0.004	0.002	0.006	0.004	0.008	0.001

ตารางผนวกที่ 7 ผลของวิธีการเก็บรักษาเชื้อ *B. thuiringiensis* JC590 ที่อุณหภูมิห้อง และ อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ในวันที่ 1 7 และ 37 ตามลำดับ เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์

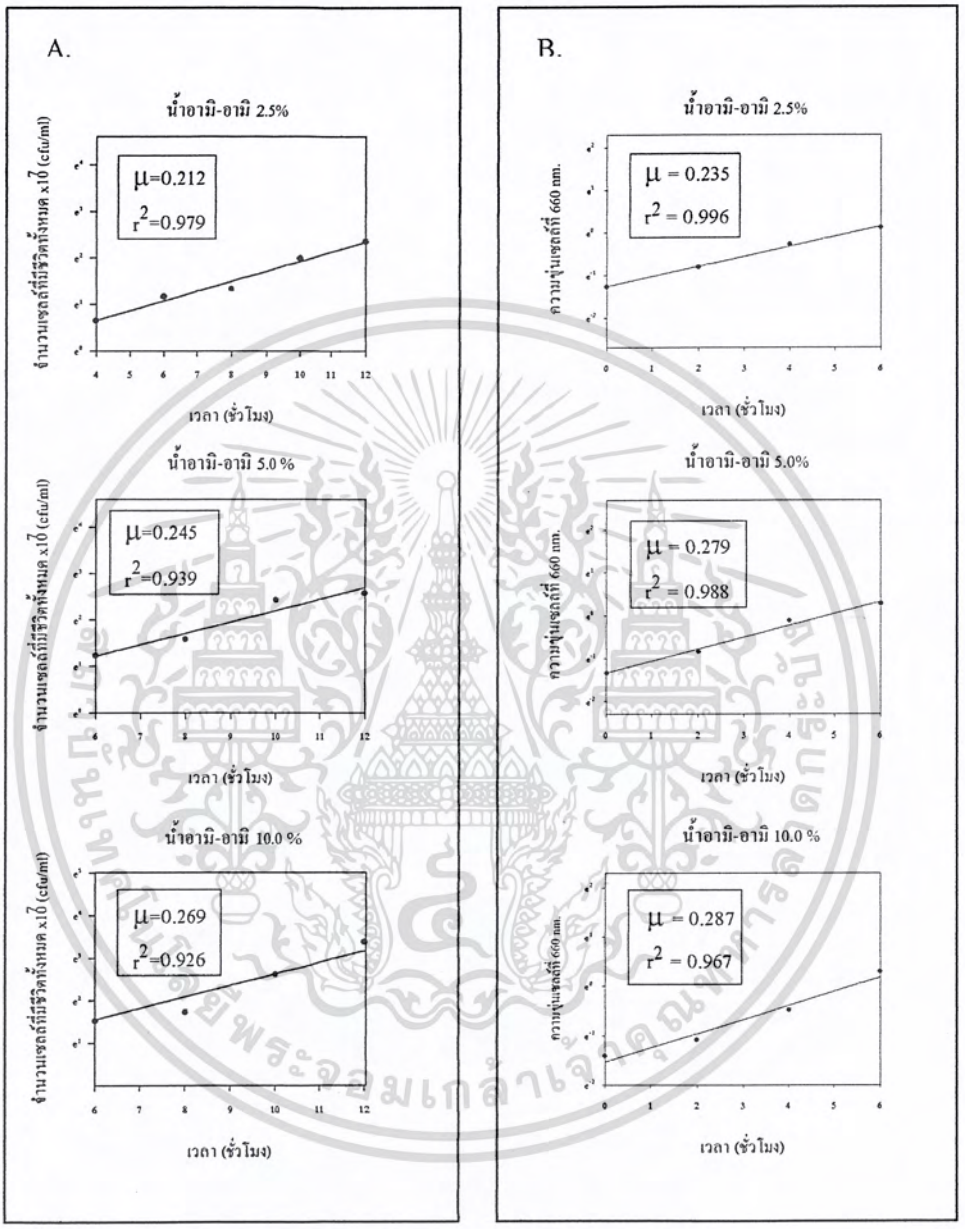
วิธีการ	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (%)						เปอร์เซ็นต์ของสปอร์ทั้งหมด (%)					
	อุณหภูมิห้อง			อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส			อุณหภูมิห้อง			อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส		
	วันที่						วันที่					
	1	7	37	1	7	37	1	7	37	1	7	37
Control	100	11.6	11.5	100	15.5	10.3	100	74.1	1.30	100	235	25.3
วิธีที่ 1	100	9.83	28.3	100	38.7	15.7	100	76.4	127	100	212	72.4
วิธีที่ 2	100	6.75	15.5	100	34.6	6.83	100	76.4	64.5	100	73.0	37.4
วิธีที่ 3	100	12.5	25.8	100	48.3	3.25	100	7.7	125	100	270	12.7
วิธีที่ 4	100	6.33	20.2	100	46.7	10.4	100	39.7	79.3	100	212	37.4
วิธีที่ 5	100	2.92	8.42	100	40.0	3.67	100	51.3	127	100	178	22.4

หมายเหตุ กำหนดให้ปริมาณเซลล์ และ สปอร์เริ่มต้น ณ วันที่ 1 ที่ทำการเก็บรักษาเชื้อในแต่ละวิธีคิดเทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>คำนวณหาค่าพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้</u>

1. อัตราจำเพาะของการเติบโต (μ)

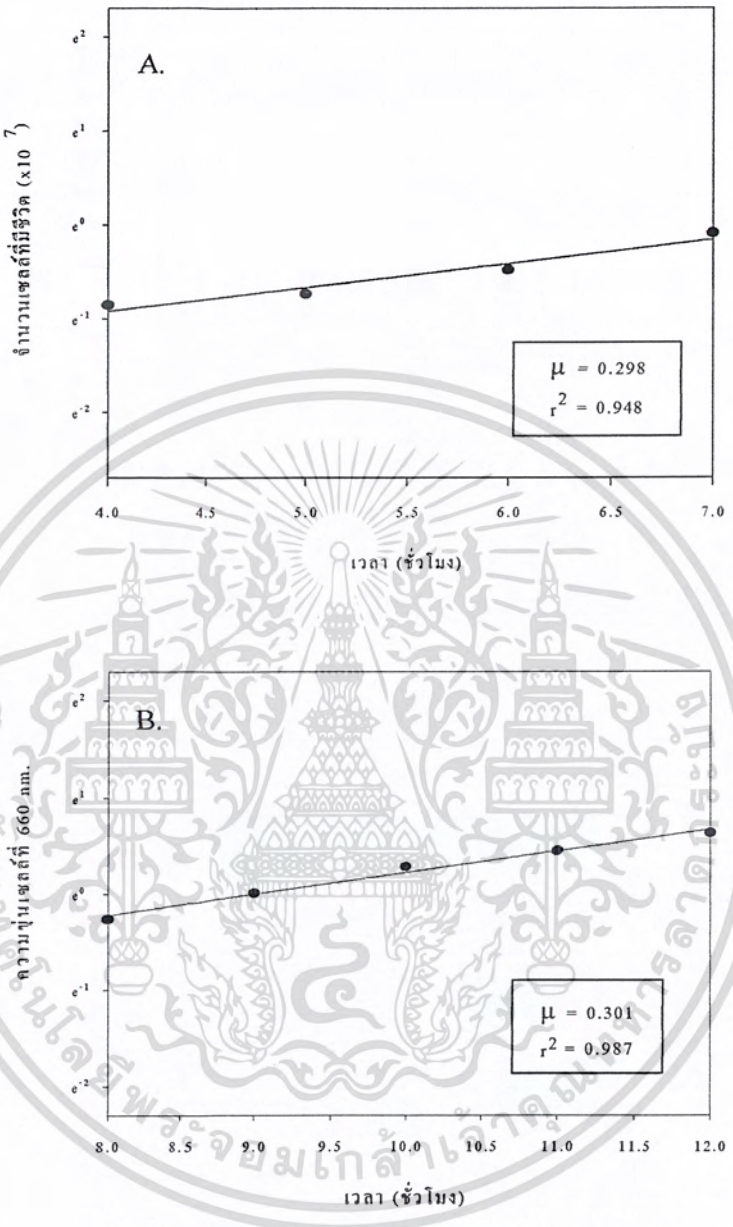


<u>ภาพผนวกที่ 3</u> อัตราการเติบโตจำเพาะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในระดับฟลาสก์ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ 2.5 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

A : อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด

B : อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) จากความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

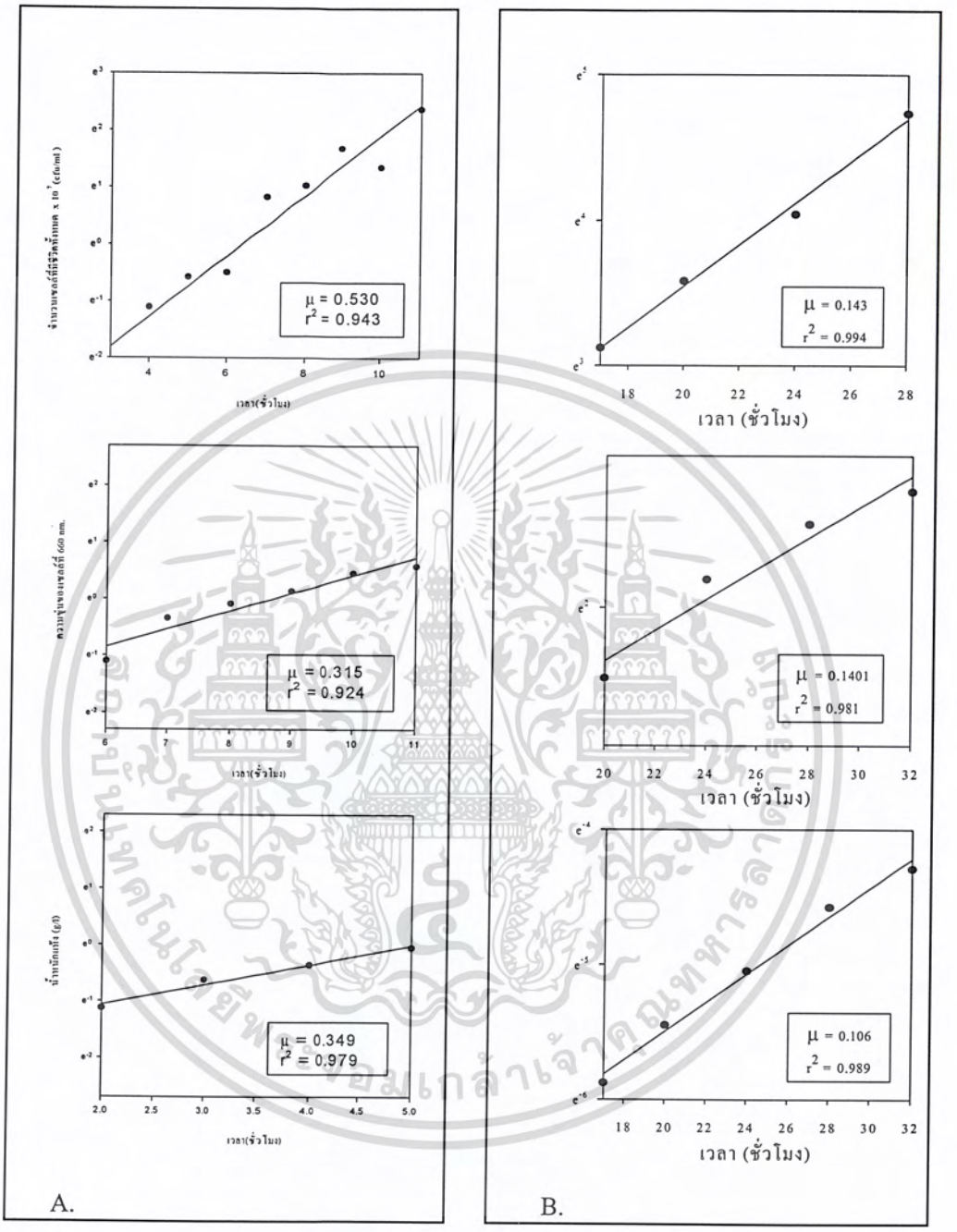


<u>ภาพผนวก4</u> อัตราการเติบโตจำเพาะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตรที่มีอัตราการกวน 1,000 รอบ/นาที และ อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

A : อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด

B : อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) จากความขุ่นของเซลล์ที่ 660 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

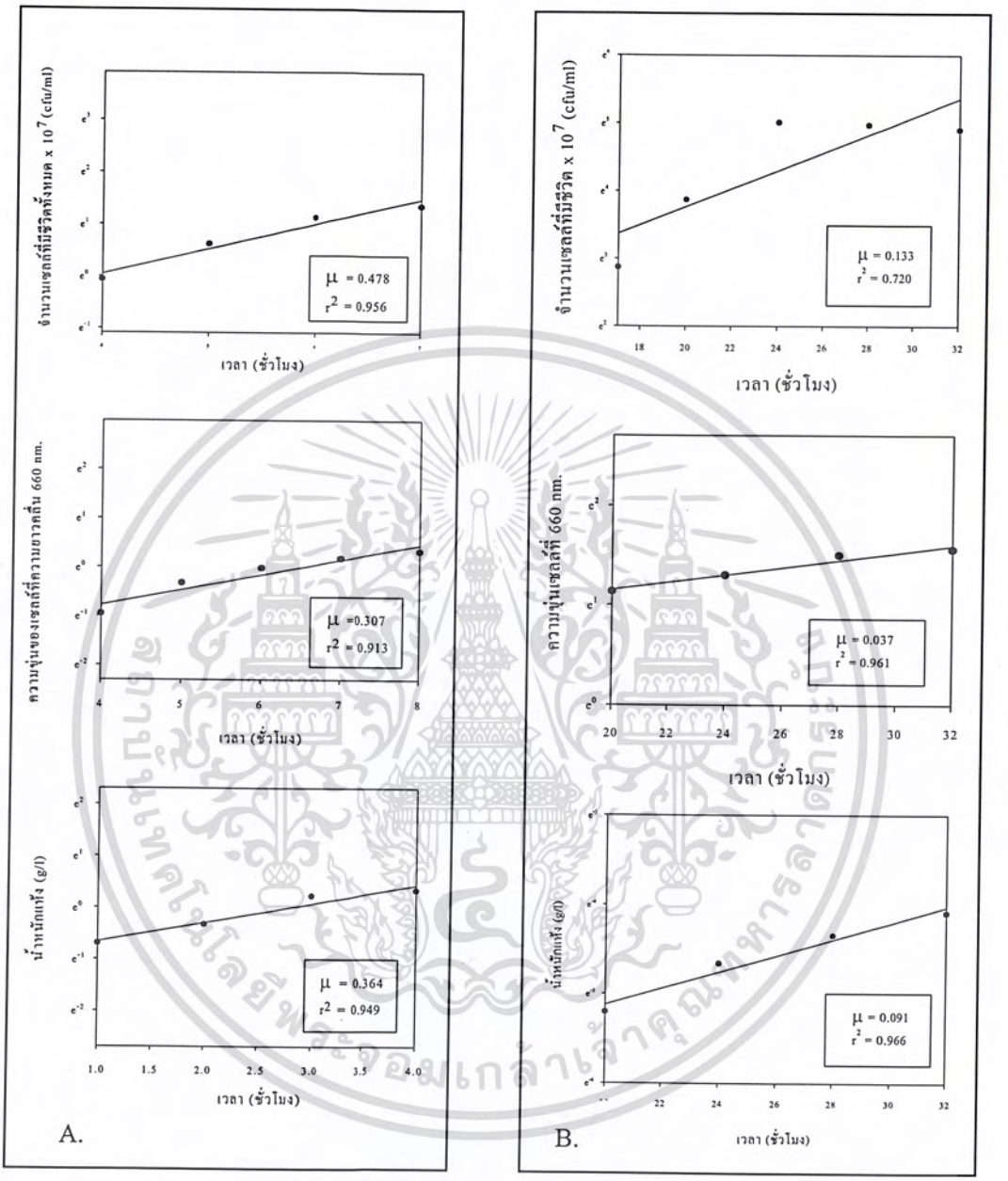


<u>ภาพผนวกที่ 5</u> อัตราการเติบโตจำเพาะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในถังหมักภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงปรับเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

A : อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(μ)ที่ความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์

B : อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(μ)ที่ความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 50 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



<u>ภาพผนวกที่ 6</u> อัตราการเติบโตจำเพาะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 ในถังหมักภายใต้สภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงปรับเป็น 10 เปอร์เซ็นต์

A : อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(μ)ที่ความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์

B : อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(μ)ที่ความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 10 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆดังนี้

1. **ผลได้ของเซลล์ (Yx/s)**

$$Yx/s = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

2. **ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (Yp/s)**

$$Yp/s = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

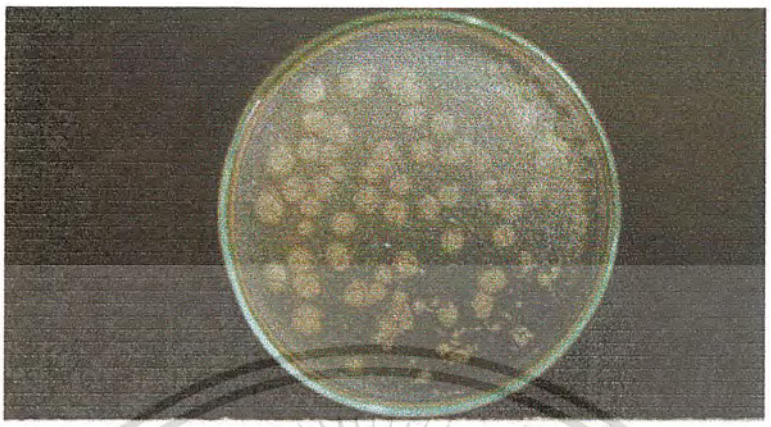
3. **อัตราการผลิตเซลล์ (Qx)**

$$\text{อัตราการผลิตเซลล์} = \frac{\text{เซลล์สุดท้าย - เซลล์เริ่มต้น}}{\text{เวลาสุดท้าย – เวลาเริ่มต้น}}$$

5. **อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (Qp)**

$$\text{อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์} = \frac{\text{ผลิตภัณฑ์สุดท้าย – ผลิตภัณฑ์เริ่มต้น}}{\text{เวลาสุดท้าย – เวลาเริ่มต้น}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 7 เชื้อ *Bacillus thuringiensis* JC590 ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จากการ spread plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้