



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (กีฏวิทยา)

ปริญญญา

กีฏวิทยา

กีฏวิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง อายุการเก็บรักษาและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590
ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius)

Shelf Life and Efficiency of *Bacillus thuringiensis* JC590 Product in Controlling
Common Cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius)

นามผู้วิจัย นางสาวตุลยา กลับแก้ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์จรรยา จันทน์ไพแสง, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์โสภณ อุไรชื่น, D.Ing.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ศาสตราจารย์อังศุมาลย์ จันทราปัดย์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

อายุการเก็บรักษาและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590
ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius)

Shelf Life and Efficiency of *Bacillus thuringiensis* JC590 Product
in Controlling Common Cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius)

โดย

นางสาวตุลยา กลับแก้ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อขอความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กัญญาวิทยา)

พ.ศ. 2551

ตุลยา กลับแก้ว 2551: อายุการเก็บรักษาและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์

Bacillus thuringiensis JC590 ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura*

(Fabricius) ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (กัญญา) สาขาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา

ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์จรรยา จันทร์ไพแสง, Ph.D. 88 หน้า

การศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 3 สูตร ซึ่งมีองค์ประกอบต่างกัน ได้แก่ สูตร 1 ประกอบด้วยเซลล์ *B. thuringiensis* JC590 เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก กากน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำมันปาล์ม 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ไข่แดง 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำตาลแล็กโทส 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และน้ำกลั่น 26 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สูตร 2 ประกอบด้วย เซลล์ *B. thuringiensis* JC590 เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก กากน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำมันปาล์ม 45 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ไข่แดง 11.25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำตาลแล็กโทส 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และน้ำกลั่น 26 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และสูตร 3 ประกอบด้วย เซลล์ *B. thuringiensis* JC590 เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก น้ำมันปาล์ม 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ไข่แดง 12.50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำตาลแล็กโทส 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และน้ำกลั่น 26 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่า ระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นานที่สุดและยังคงมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) ในห้องปฏิบัติการ คือ 60 วัน โดยผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 สูตร 1 สูตร 2 และสูตร 3 มีจำนวนการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมดคิดเป็น 14.28, 11.21 และ 15.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่าความเข้มข้นที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) เท่ากับ 1.82×10^9 , 1.36×10^{11} และ 3.26×10^9 cfu/ml ตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักที่เข้าทำลายต้นผักคะน้าในเรือนปลูกพืชทดลองอยู่ในระดับดีไม่แตกต่างจากผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ทางการค้า จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า องค์ประกอบของผลิตภัณฑ์มีผลต่ออายุการเก็บรักษาและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช จึงควรพัฒนาสูตรการปรุงแต่งผลิตภัณฑ์เพื่อให้ได้สารชีวภัณฑ์ที่มีอายุการเก็บรักษาได้นานและมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไป

Tunlaya Klabkaew 2008: Shelf Life and Efficiency of *Bacillus thuringiensis* JC590 Product in Controlling Common Cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius). Master of Science (Entomology), Major Field: Entomology, Department of Entomology. Thesis Advisor: Associate Professor Jariya Chanpaisaeng, Ph.D. 88 pages.

The shelf life of 3 formulas of *Bacillus thuringiensis* JC590 product was studied at room temperature. The formula 1 consisted of 10% (w/v) *B. thuringiensis* JC590 concentrate, 10% (v/v) molasses, 40% (v/v) palm oil, 10% (v/v) egg yolk, 4% (w/v) lactose and 26% (v/v) distilled water, formula 2 consisted of 10% (w/v) *B. thuringiensis* JC590 concentrate, 5% (v/v) molasses, 45% (v/v) palm oil, 11.25% (v/v) egg yolk, 4% (w/v) lactose and 26% (v/v) distilled water and formula 3 consisted of 10% (w/v) *B. thuringiensis* JC590 concentrate, 50% (v/v) palm oil, 12.50% (v/v) egg yolk, 4% (w/v) lactose and 26% (v/v) distilled water. The best time for product shelf life which had high efficiency in controlling common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) in laboratory was 60 days. The survival spore count of *B. thuringiensis* JC590 product formula 1, formula 2 and formula 3 were 14.28%, 11.21% and 15.06 %, and they had LC_{50} value 1.82×10^9 , 1.36×10^{11} and 3.26×10^9 cfu/ml, respectively. Bioassay and product test in greenhouse of 3 formulas did not show the significantly different efficiency in controlling common cutworm in Chinese kale when compared with the commercial product of *B. thuringiensis*. These results showed that product components of *B. thuringiensis* could affect product shelf life and efficiency in controlling insect pests. This could be preliminary development of *B. thuringiensis* product formula with long shelf life and high efficiency in insect pest control.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.จริยา จันทน์ไพแสง ประธานคณะกรรมการที่ปรึกษา ที่ให้การอบรมสั่งสอน คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ทำการ ศึกษาวิจัยและการตรวจแก้วิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสภณ อุไรชื่น กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ กรรมการที่ปรึกษาวิชา รอง และศาสตราจารย์ ดร.สาวิตรี ลิ้มทอง ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และ ตรวจแก้วิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ การ อบรมสั่งสอนและคำแนะนำมาโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาสถิติวิทยา ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาเทคโนโลยีทาง กระบวนการเคมีและฟิสิกส์ และศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่ ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำวิจัย ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นิสิตสาขาวิชาสถิติวิทยา สาขาการจัดการศัตรูพืชและสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกคน ที่ให้กำลังใจ และความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ศึกษา

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ที่ให้ความรัก ความอบอุ่น คอย ห่วงใย ให้คำปรึกษาแนะนำ เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนทุกอย่างเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ศุลยา กลับแก้ว

กันยายน 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	29
อุปกรณ์	29
วิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	37
สรุปและข้อเสนอแนะ	59
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	61
ภาคผนวก	75
ภาคผนวก ก	76
ภาคผนวก ข	79
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	88

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายชื่อผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด	19
2	ส่วนผสมในการปรุงแต่งสูตรผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590	30
3	อัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด หลังทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590 ทั้ง 3 สูตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน	40
4	อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมด หลังทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590 ทั้ง 3 สูตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน	44
5	จำนวนสปอร์ทั้งหมดที่รอดชีวิต หลังทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590 ทั้ง 3 สูตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน	46
6	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590 3 สูตร และอัตราการตายที่แท้จริงของหนอนกระทู้ผัก <i>Spodoptera litura</i> (Fabricius) หลังทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน	49
7	ค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590 3 สูตร ที่ทำให้หนอนกระทู้ผัก <i>Spodoptera litura</i> (Fabricius) ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC ₅₀) หลังทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน	51
8	ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590 ทั้ง 3 สูตร ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก <i>Spodoptera litura</i> (Fabricius) หลังการฉีดพ่นในเรือนปลูกพืชทดลอง เป็นเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง	54

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข 1 จำนวนเซลล์และสปอร์ทั้งหมด หลังการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590 ทั้ง 3 สูตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน	80
ข 2 จำนวนและเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก <i>Spodoptera litura</i> (Fabricius) หลังจากได้รับผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590 ทั้ง 3 สูตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	82
ข 3 จำนวนหนอนกระทู้ผัก <i>Spodoptera litura</i> (Fabricius) ที่ตาย หลังจากได้รับผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590 ทั้ง 3 สูตร ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	83

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะโคโลนี เซลล์ สปอร์ และผลึกโปรตีนของ <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
2 การสร้างสปอร์ (S) และผลึกโปรตีน (CP) ของ <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
3 ลักษณะรูปร่างผลึกโปรตีนของ <i>Bacillus thuringiensis</i> ที่ถ่ายจากกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)	7
4 รูปร่างโครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีน Cry	9
5 แผนผังแสดงการตัด Cry protoxin ด้วยเอนไซม์ proteases ในกระเพาะอาหาร ส่วนกลางของแมลง	13
6 กลไกการเข้าทำลายแมลงของ <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
7 รูปร่างลักษณะของหนอนกระทู้ผัก <i>Spodoptera litura</i> (Fabricius) แต่ละระยะ	26
8 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590 ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก <i>Spodoptera litura</i> (Fabricius) ในห้องปฏิบัติการ	33
9 ผลิตภัณฑ์ปรุงแต่ง <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590	37
10 อัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590 ทั้ง 3 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน	41
11 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590 ทั้ง 3 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน	45
12 ลักษณะของใบผักคะน้าที่ถูกหนอนกระทู้ผัก <i>Spodoptera litura</i> (Fabricius) ทำลายหลังการฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> ในเรือนปลูกพืชทดลอง	55
13 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590 ที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บรักษา	57
14 ลักษณะของใบผักคะน้าหลังการฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> JC590	58

อายุการเก็บรักษาและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius)

Shelf Life and Efficiency of *Bacillus thuringiensis* JC590 Product in Controlling Common Cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius)

คำนำ

ปัจจุบันการนำสารชีวภัณฑ์ในกลุ่มแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ไวรัส NPV ไล่เดือน ฝอยศัตรูแมลง (*Steinernema carpocapsae*) เชื้อราเขียว (*Metharhizium anisopliae*) และเชื้อราขาว (*Beauveria bassiana*) เข้ามาใช้ทดแทนสารเคมีกำจัดแมลง มีแนวโน้มที่จะให้ผลดีและเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในกลุ่มแมลงศัตรูพืชผัก ซึ่งพบหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งที่สร้างความเสียหายต่อพืชผักทั้งด้านผลผลิตและคุณภาพ ทำให้เกษตรกรต้องใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช ซึ่งเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานๆ จะเกิดปัญหาการสร้างความต้านทานขึ้น ทำให้ต้องเพิ่มปริมาณการใช้มากขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลให้มีสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชตกค้างในผลผลิตและสิ่งแวดล้อม และก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพต่อผู้บริโภคและเกษตรกร ดังนั้นการนำจุลินทรีย์มาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชเพื่อลดการใช้สารเคมี จึงต้องคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการเข้าทำลายแมลง สามารถเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณในตัวแมลงได้มากและรวดเร็ว โดยไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ พืช และไม่มีสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม ตลอดจนสามารถผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรม มีอายุการเก็บรักษาได้นานในอุณหภูมิปกติ และราคาเป็นธรรม

Bacillus thuringiensis เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมแมลงหลายชนิด พบกระจายตัวอยู่ตามธรรมชาติ ในดิน เศษซากพืช และซากสัตว์ รวมไปถึงบริเวณผิวใบพืช เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างเซลล์รูปท่อนตรงต่อกันเป็นสายโซ่ มีการสร้างสปอร์และผลึกโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการทำลายตัวอ่อนของแมลงในกลุ่มผีเสื้อ แมลงวัน และด้วง อย่างจำเพาะเจาะจง โดยจะออกฤทธิ์ได้เมื่อตัวอ่อนของแมลงกินผลึกโปรตีนเข้าไปในกระเพาะอาหาร สภาพความเป็นด่างและเอนไซม์ในกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลงจะละลายและย่อยผลึกโปรตีนให้มีขนาดเล็กลง และมีพิษเข้าทำลายเซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหารให้บวมและแตกออกทำให้เกิดช่องว่าง ส่งผลให้

สารพิษเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต เกิดการไหลเวียนของสารต่างๆ ระหว่างภายในกระเพาะอาหาร และช่องว่างภายในลำตัว ทำให้สมดุลร่างกายของแมลงเปลี่ยนไป แมลงจะเป็นอัมพาต หยุดกินอาหารและตายในที่สุด *Bacillus thuringiensis* มีประสิทธิภาพดี เมื่อนำไปใช้ในแปลงปลูก ง่ายต่อการผลิต ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย เช่น คน สัตว์เลี้ยง และแมลงอื่นๆ ที่ไม่ใช่แมลงศัตรูพืช นอกจากคุณสมบัติของ *Bacillus thuringiensis* แต่ละสายพันธุ์แล้ว ประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงยังขึ้นอยู่กับวิธีการใช้ คุณสมบัติและรูปแบบของผลิตภัณฑ์ ซึ่งผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* ที่ใช้ทางการเกษตรที่มีจำหน่ายในท้องตลาดส่วนใหญ่ มี 2 รูปแบบ คือ อนุภาคน้ำเข้มข้น (flowable concentrates) และรูปผงละลายน้ำ (wettable powders) โดยมีส่วนประกอบของสารปรุงแต่งต่างๆ ที่มีคุณสมบัติในการป้องกันเซลล์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมแมลง และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ให้นานยิ่งขึ้น

การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาถึงอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 สูตรต่างๆ ซึ่งผลิตจาก *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในประเทศไทย พร้อมทั้งทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการควบคุมหนอนกระทู้ผักทั้งในห้องปฏิบัติการและเรือนปลูกพืชทดลอง เพื่อให้ทราบถึงระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช และเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์อื่นๆ

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาเปรียบเทียบอายุการเก็บรักษาสูตรปรุงแต่งผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 3 สูตร
2. ทดสอบประสิทธิภาพของสูตรปรุงแต่งผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) ในห้องปฏิบัติการและเรือนปลูกพืชทดลอง

การตรวจเอกสาร

1. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับ *Bacillus thuringiensis* (Bt)

1.1 ประวัติความเป็นมาของ *Bacillus thuringiensis* (Bt)

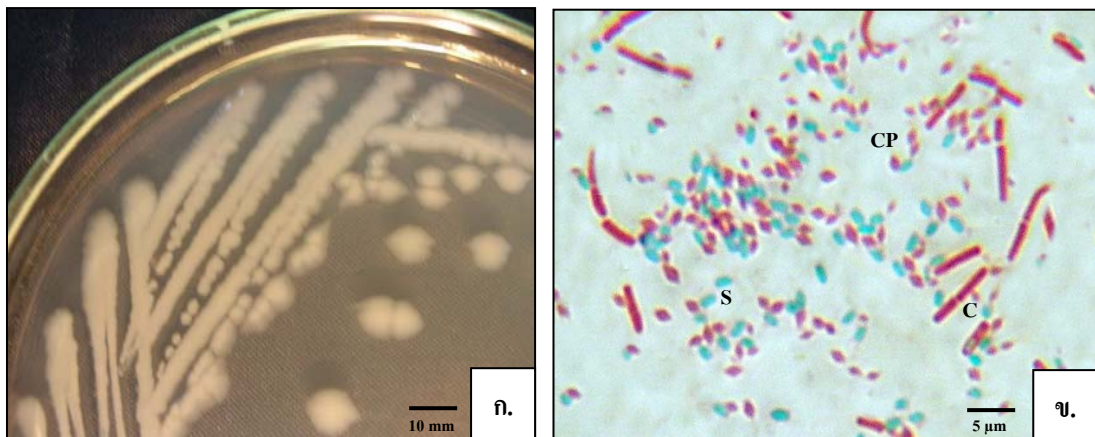
มีบันทึกการค้นพบ *Bacillus thuringiensis* (Bt) เป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1915 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อ Berliner ได้แยกเชื้อจาก Mediterranean flour moth (*Anagasta kuehniella*) และตั้งชื่อว่า *Bacillus thuringiensis* ตามชื่อเมืองที่พบเชื้อคือเมือง Thuringia ประเทศเยอรมนี แม้ว่าจะเป็นครั้งแรกที่มีการจดบันทึกภายใต้ชื่อ *B. thuringiensis* แต่ก็ไม่ใช่ว่าครั้งแรกที่มีการแยกเชื้อได้ เนื่องจากในปี ค.ศ. 1901 Ishiwata Shigetane นักชีววิทยาชาวญี่ปุ่นได้แยกเชื้อชนิดเดียวกันนี้จากหนอนไหมที่เป็นโรค “sotto disease” (Roh *et al.*, 2007) โดยตั้งชื่อว่า *Bacillus sotto* (Caulder, 1999) แต่ไม่ได้มีการจดบันทึกไว้ ด้วยเหตุนี้ตามกฎของ Bacterial Nomenclature จึงให้เกียรติแก่ Berliner ทำให้มีการยอมรับชื่อ *B. thuringiensis* (Steinhaus, 1961; Tanada and Kaya, 1993) แม้ว่าเดิม *B. thuringiensis* จะเป็นอันตรายต่อการเพาะเลี้ยงไหม แต่ต่อมาพบว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญมากต่อการใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยนักวิจัยชาวฝรั่งเศสได้พยายามพัฒนา *B. thuringiensis* เพื่อนำไปใช้ควบคุมหนอนผีเสื้อในแปลงปลูกพืช จนกระทั่งในปี ค.ศ.1938 ได้มีการผลิต *B. thuringiensis* เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าสำเร็จเป็นครั้งแรก โดยมีชื่อทางการค้าว่า Sporeine® (Lambert and Peferoen, 1992)

ในปี ค.ศ. 1953 Hannay ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* ในระยะที่กำลังสร้างสปอร์และพบโครงสร้างอย่างหนึ่งในเซลล์ โดยให้ชื่อว่า parasporal bodies และได้ให้ข้อสังเกตว่าโครงสร้างที่พบน่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคของแมลง จนกระทั่งในปี ค.ศ.1956 Angus จึงพิสูจน์ได้ว่าข้อสังเกตของ Hannay นั้นเป็นความจริง (Angus, 1956) ต่อมา Bonnefoi and de Barjac (1963) ได้พบวิธีการวิเคราะห์เพื่อแยกสายพันธุ์ *B. thuringiensis* โดยดูจากปฏิกิริยาของ antibody ที่มีผลต่อ flagella protein หรือที่เรียกว่า H-antigen และเรียกสายพันธุ์ต่างๆ ที่จำแนกโดยวิธีนี้ว่า H-serotype (de Barjac and Frachon, 1990) ซึ่งปัจจุบันพบ *B. thuringiensis* มากกว่า 69 serotypes 13 sub-antigenic groups และแบ่งย่อยออกเป็น 82 serovars (subspecies) (Lecadet *et al.*, 1999) ในเวลาต่อมาการศึกษาส่วนใหญ่จะเน้นเกี่ยวกับอินทีเกรชันการสร้างโปรตีนสารพิษ ทำให้มีการพบ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ใหม่ๆ มากขึ้น หลังจาก Kurstak และ Dulmage แยกเชื้อ

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* สายพันธุ์ HD-1 (de Barjac and Lemille, 1970) ได้จากหนอนเจาะสมอฝ้าย (Pectinophora gossypiella) ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์มาตรฐานสำหรับศึกษา *B. thuringiensis* subsequent (Dulmage, 1970) ส่งผลให้มีการค้นหาสายพันธุ์อื่นๆ จนทำให้ค้นพบสายพันธุ์ใหม่ๆ เพิ่มขึ้น เช่น Goldberg and Margalit (1977) ได้แยก *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* จากตัวอ่อนดินในประเทศอิสราเอล ที่มีฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงและริ้นดำที่เป็นพาหะนำโรค (Lacey and Undeen, 1986) และ Krieg *et al.* (1983) ได้ค้นพบ *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ซึ่งแยกเชื้อได้จากตัวอ่อนของมอดแป้ง (*Tenebrio molitor*) ในประเทศเยอรมนี ที่มีฤทธิ์ต่อหนอนด้วงหลายๆ ชนิด และมีพิษค่อนข้างรุนแรงกับตัวอ่อนของด้วงวงศ์ Chrysomelidae เช่น ด้วงหมัดกระโดด Boucias and Pendland (1998) คาดว่าทั่วโลกน่าจะมีแบคทีเรียชนิดนี้ประมาณ 60,000 สายพันธุ์ โดยมีฤทธิ์กับแมลงในอันดับ Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Mallophaga, ไล่เดือน ผอ่ย, โปรโตซัว และไร (Beegle and Yamamoto, 1992; Feitelson *et al.*, 1992; Feitelson, 1993) สำหรับในประเทศไทยมีการจำแนกโดย serotype ไปได้ 17 serotypes (จริยา และคณะ, 2547)

1.2 ลักษณะทางชีววิทยาของ *Bacillus thuringiensis*

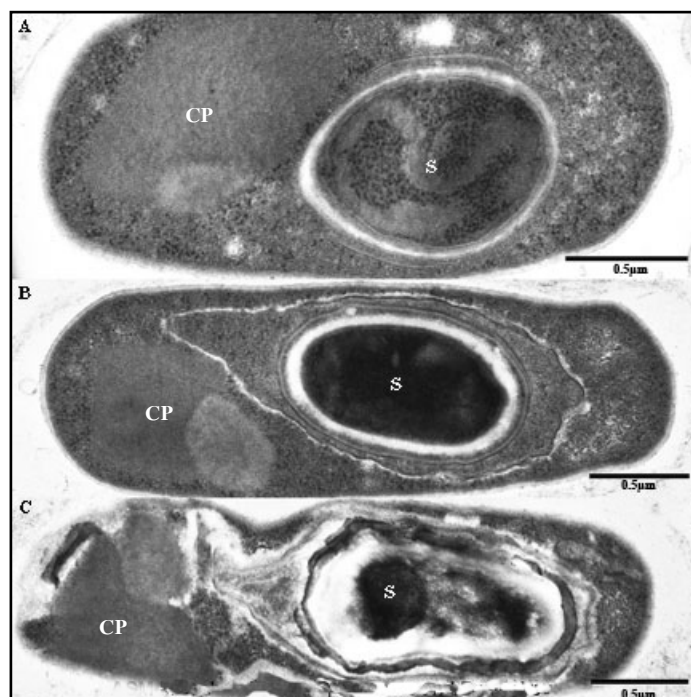
B. thuringiensis สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ความหลากหลายของสายพันธุ์ที่แยกได้ทั่วโลกมาจากหลายๆ แหล่ง เช่น ดิน ชากแมลง รำข้าว เศษซากพืช เป็นต้น (Martin and Travers, 1989; Bernhard *et al.*, 1997) *B. thuringiensis* จัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae และมีความใกล้ชิดกับ *Bacillus cereus* (Jensen *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) มีการสร้างสปอร์และจัดอยู่ในกลุ่ม facultative aerobic bacteria คือสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย แต่ขณะสร้างสปอร์จะต้องการสภาพที่มีอากาศอย่างเต็มที่ มีรูปร่างเป็นท่อนตรง (rod shape) ขนาด 1-1.2 x 3-5 ไมครอน (Boucias and Pendland, 1998) เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลา (flagella) (ทิพย์วดี, 2535) ถ้านำมาเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) โคโลนีจะมีลักษณะสีขาวขุ่น ผิวไม่มัน ขอบไม่เรียบ (ภาพที่ 1) ขนาดค่อนข้างใหญ่ประมาณ 5-10 มิลลิเมตร (อัจฉรา, 2544) โดยจะสร้างสปอร์ภายในเซลล์ที่เรียกว่า เอนโดสปอร์ (endospore) ขนาด 0.8 x 1.7 ไมครอน อยู่ที่ปลายด้านหนึ่งของเซลล์ และสร้างผลึกโปรตีนที่เรียกว่า Parasporal body, Crystal protein, Cry proteins หรือ δ -endotoxin ขนาด 0.5 x 1 ไมครอน อยู่ที่ปลายอีกด้านหนึ่งไปพร้อมๆ กัน (ภาพที่ 2) (Burges and Jones, 1998) ผลึกโปรตีนมีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปปิรามิดคู่ฐานขนนก (bipyramid) รูปทรงกลม (spherical) รูปลูกบาศก์ (cuboidal) เป็นต้น ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ (ภาพที่ 3) (Burges and Hussey, 1971)



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนี เซลล์ สปอร์ และผลึกโปรตีนของ *Bacillus thuringiensis*

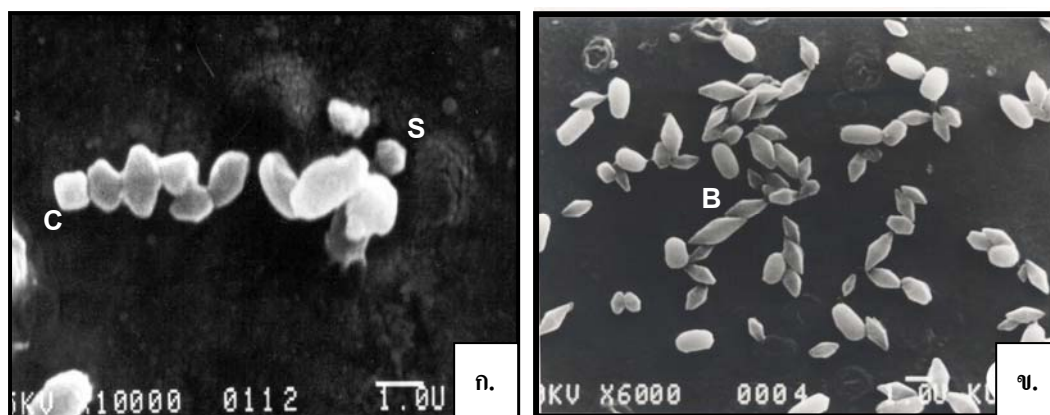
ก. โคโลนีของ *Bacillus thuringiensis* ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร nutrient agar (NA)

ข. ลักษณะของเซลล์ (cell, C) สปอร์ (spore, S) และผลึกโปรตีน (crystal protein, CP)



ภาพที่ 2 การสร้างสปอร์ (S) และผลึกโปรตีน (CP) ของ *Bacillus thuringiensis*

ที่มา: Moyes and Droleskey (2007)



ภาพที่ 3 ลักษณะรูปร่างผลึกโปรตีนของ *Bacillus thuringiensis* ที่ถ่ายจากกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)

ก. ผลึกโปรตีนรูปลูกบาศก์ (cuboidal, C) และรูปทรงกลม (spherical, S)

ข. ผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ฐานชนกัน (bipyramid, B)

ที่มา: จริยา และคณะ (2547); ประกาย (2549)

1.3 วงจรชีวิตของ *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis มีการเจริญ 2 ระยะ คือ ระยะการเจริญ (vegetative growth) และระยะการสร้างสปอร์ (sporulation) ในขณะที่เซลล์อยู่ในระยะการเจริญ เมื่อมีธาตุอาหารอุดมสมบูรณ์และสภาวะแวดล้อมเหมาะสม สปอร์จะพัฒนา (germination) เป็นเซลล์รูปท่อนตรง (rod shape) ภายในเวลา 12 ชั่วโมง และมีการแบ่งตัวได้เซลล์ต่อกันเป็นสายลูกโซ่ หลังจากนั้นอีก 24-48 ชั่วโมง *B. thuringiensis* จะมีการสร้างสปอร์และผลึกโปรตีน ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อธาตุอาหารเริ่มน้อยลงและสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม การสร้างสปอร์จะเกิดขึ้นภายในอับสปอร์ (sporangium) ที่ปลายด้านหนึ่งของเซลล์ สปอร์จะทนต่อความร้อนและความแห้งแล้ง จึงทำให้ *B. thuringiensis* สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม (Lambert and Peferoen, 1992) ในขณะเดียวกันที่ปลายอีกด้านของเซลล์จะมีการสร้างผลึกโปรตีน โดยจะเสร็จสมบูรณ์พร้อมๆ กับการสร้างสปอร์ เมื่อผนังเซลล์ของ *B. thuringiensis* สลายตัวไป สปอร์จะกระจายตัวไปในธรรมชาติ เมื่อมีสภาวะเหมาะสม สปอร์จะพัฒนา (germination) เป็นเซลล์และจะขยายพันธุ์แบบนีต่อไป (Entwistle *et al.*, 1993)

1.4 ผลึกโปรตีนของ *Bacillus thuringiensis*

ผลึกโปรตีนมีลักษณะเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ ประกอบด้วยโปรตีนโมเลกุลย่อยๆ ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท glycoprotein เกาะกันด้วยพันธะ Disulfide bond (S-S) มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารของแมลง ผลึกโปรตีนไม่ละลายในน้ำและสารละลายอินทรีย์ แต่จะละลายในสารละลายที่มีคุณสมบัติเป็นด่างสูง แต่ในสภาพที่มี pH ต่ำ จะต้องมีการมี reducing agent เป็นตัวช่วยให้ละลาย เช่น กระเพาะอาหารส่วนกลาง (midgut) ของแมลง ซึ่งมีระดับ pH 10-11 จะมีเอนไซม์ proteolytic เป็นตัวช่วยละลาย (Tanada and Kaya, 1993)

ผลึกโปรตีนเป็นหน่วยที่สร้างสารพิษ ซึ่งถูกกำหนดโดยยีน *cry* หรือ *cyt* เพื่อทำลายแมลง ชนิดของโปรตีนที่แตกต่างกันจะมีฤทธิ์ในการเข้าทำลายกลุ่มของแมลงต่างกัน โดยทั่วไปจะมีฤทธิ์ต่อแมลงในแต่ละอันดับ 2-3 ชนิด (de Maagd *et al.*, 2001) และโปรตีนบางชนิดจะมีฤทธิ์กับแมลงมากกว่า 1 อันดับ เช่น โปรตีน Cry 1Ba มีฤทธิ์มากต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera, Diptera และ Coleoptera (Zhong *et al.*, 2000) Höfte and Whiteley (1989) ได้จำแนกโปรตีน Cry (Crystal protein) ออกเป็นกลุ่ม โดยดูจากลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันและความสามารถในการเข้าทำลายแมลงแต่ละชนิด คือ โปรตีน Cry I มีฤทธิ์กับแมลงในอันดับ Lepidoptera โปรตีน Cry II มีฤทธิ์กับแมลงในอันดับ Lepidoptera และ Diptera โปรตีน Cry III มีฤทธิ์กับแมลงในอันดับ Coleoptera โปรตีน Cry IV มีฤทธิ์กับแมลงในอันดับ Diptera โปรตีน Cry V และโปรตีน Cry VI ที่มีฤทธิ์กับไส้เดือนฝอย (Feitelson *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังมีโปรตีน Cyt (Cytolytic) ซึ่งมีความสามารถในการย่อยเซลล์ (cytolytic activity) และมีความจำเพาะกับแมลงในอันดับ Diptera

ต่อมาได้มีการปรับปรุงระบบการจำแนกชนิดของโปรตีน โดยใช้ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนและจะอาศัยการกระจายตัวทางวิวัฒนาการร่วมด้วย โปรตีนที่รู้จักในภายหลังการจำแนกแต่ละกลุ่มจะประกอบด้วย Cry หรือ Cyt ตามด้วยเลขอารบิก อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่และตัวพิมพ์เล็ก (เช่น Cry25Aa1) ขึ้นอยู่กับตำแหน่งใน phylogenetic tree (Crickmore *et al.*, 1998) โดยตัวเลขอารบิกในตำแหน่งแรกแทนชื่อ subfamily ซึ่งใน subfamily เดียวกันจะมีผลต่อแมลงในอันดับเดียวกัน และมีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนน้อยกว่า 45 เปอร์เซ็นต์ อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่จะแทนชื่อกลุ่ม (group) ภายในกลุ่มเดียวกันจะมีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโน 78 เปอร์เซ็นต์ และอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก ถ้าเป็นอักษรเดียวกันจะมี

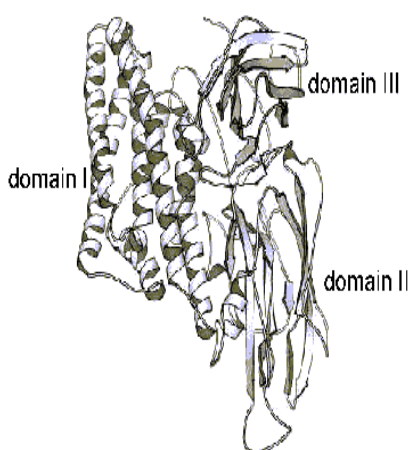
ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโน 95 เปอร์เซ็นต์ ข้อมูลการจำแนกสามารถสืบค้นได้จาก http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/ (Crickmore *et al.*, 2008)

โครงสร้างของผลึกโปรตีนประกอบด้วย 3 Domain จากปลาย N-terminal ไปยังปลายอีกข้างหนึ่งซึ่งเป็น C-terminal (ภาพที่ 4) มีหน้าที่แตกต่างกันคือ

Domain I มีลักษณะโครงสร้างแบบ α -helixs ขดเกลียว 7 สาย ทำหน้าที่ในการแทรกทะลุผ่านเซลล์เยื่อหุ้มกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลง ทำให้กระเพาะอาหารของแมลงเกิดรอยรั่ว (pore formation)

Domain II ถัดจาก Domain I มีลักษณะโครงสร้างแบบ anti-parallel β -pleated sheet 3 แผ่น มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ทำหน้าที่ในการจับกับ receptor บนเซลล์เยื่อหุ้มกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลง

Domain III ถัดจาก Domain II มีลักษณะโครงสร้างแบบ β -sandwich มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ทำหน้าที่เป็นตัวรักษาความคงทนของสารพิษระหว่างกระบวนการย่อยโปรตีน และจดจำขั้นตอนการจับกับ receptor จึงทำให้ชนิดของโปรตีนเกิดความจำเพาะกับชนิดของแมลง



ภาพที่ 4 รูปร่างโครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีน Cry

ที่มา: de Maagd and Naimov (2003)

1.5 สารพิษที่สร้างโดย *Bacillus thuringiensis*

สารพิษที่ *B. thuringiensis* สร้างขึ้นและมีฤทธิ์ในการกำจัดแมลง สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มดังนี้

1. Alpha-exotoxin (α -exotoxin) หรือ lecithinase C หรือ phospholipase C เป็นสารที่สร้างภายในเซลล์ขณะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตเต็มที่และจะปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ พบโดย Toumanoff จึงเรียกว่า Toumanoff's factor เป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อน ละลายได้ในน้ำ มีคุณสมบัติเป็น hemolysin คือสามารถทำลายเซลล์เม็ดเลือด และมีผลขัดขวางการทำงานของสรีรวิทยาหลายอย่างในตัวแมลง (ทิพย์วดี, 2535) มีน้ำหนักโมเลกุล 40-50 กิโลดาลตัน (kDa) (Beegle and Yamamoto, 1992) และมีรายงานว่า เป็นพิษกับแมลง หนู และสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ

2. Beta-exotoxin (β -exotoxin) หรือ thuringiensin, thermostable toxin, fly toxin เป็นสารที่สร้างขึ้นระหว่างระยะ vegetative growth (Khetan, 2001) มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ได้นาน 15 นาที โดย McConnell and Richards (1959) ได้ค้นพบสารพิษชนิดนี้ในอาหารเลี้ยง *B. thuringiensis* ที่เข้าตู้อบเป็นเวลา 15 นาที มีพิษค่อนข้างสูงกับแมลงหลายอันดับคือ Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera, Isoptera และ Orthoptera รวมทั้งไรและไส้เดือนฝอย (Beebe and Bond, 1973) β -exotoxin สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดด้วยกัน คือ β -exotoxin type I ได้มาจาก *B. thuringiensis* serotype 1, 9 และ 10 ทำหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และ β -exotoxin type II ได้มาจาก *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* serotype 8ab (Levinson, 1990) β -exotoxin ไม่สามารถผ่านผนังกระเพาะอาหารของแมลงได้ เพราะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ phosphatase ในกระเพาะอาหารของแมลง (McConnell and Richards, 1959) เมื่อแมลงได้รับพิษนี้จะทำให้รูปร่างเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะส่วนของปาก หัว และปีก โดยการเปลี่ยนแปลงนี้จะพบในระยะลอกคราบออกจากดักแด้ (Tanada and Kaya, 1993) และในขณะที่มีการเจริญเติบโต เช่น ตัวอ่อนไม่เข้าดักแด้ หรือดักแด้มีรูปร่างบิดเบี้ยวและออกเป็นตัวเต็มวัยไม่สมบูรณ์ (อจลรา, 2544)

3. Delta-endotoxin (δ -endotoxin) พบครั้งแรกโดย Hannay เมื่อปี ค.ศ.1953 ในหนอนไหม นอกจากนี้ยังพบใน *B. subtilis*, *B. laterosporus*, *B. popilliae* และ *Clostridium cochlearium* มีผลเฉพาะกับหนอนผีเสื้อบางชนิด ยุงและริ้นเท่านั้น (ทิพย์วดี, 2535) มีชื่อเรียกหลายชื่อเช่น crystal toxin หรือ parasporal inclusion body เป็นสารพิษที่ไม่ทนต่อความร้อน มีลักษณะเป็น proteinoeous crystal ซึ่งมีทั้งสารพิษและเอนไซม์เกาะกันเป็นรูปดัมเบลล์ (dumb-bell shape) รูปร่างของผลึกโปรตีนจะสัมพันธ์กับความสามารถในการก่อโรครากับกลุ่มของแมลง เช่น รูปปิรามิดคู่ฐานชนกันมีฤทธิ์ต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera ในขณะที่รูปกลมและรูปลูกบาศก์มีฤทธิ์ต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera และ Diptera (Tanada and Kaya, 1993) มีน้ำหนักโมเลกุล 60-70 กิโลดาลตัน เมื่ออยู่ในรูปของ active form (Khetan, 2001) จะไม่ละลายในน้ำ สารละลายที่เป็นกลางหรือกรด แต่สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นด่าง ($\text{pH} > 10.5$) หรือในสารละลาย thiol reagent (Benoit *et al.*, 1995)

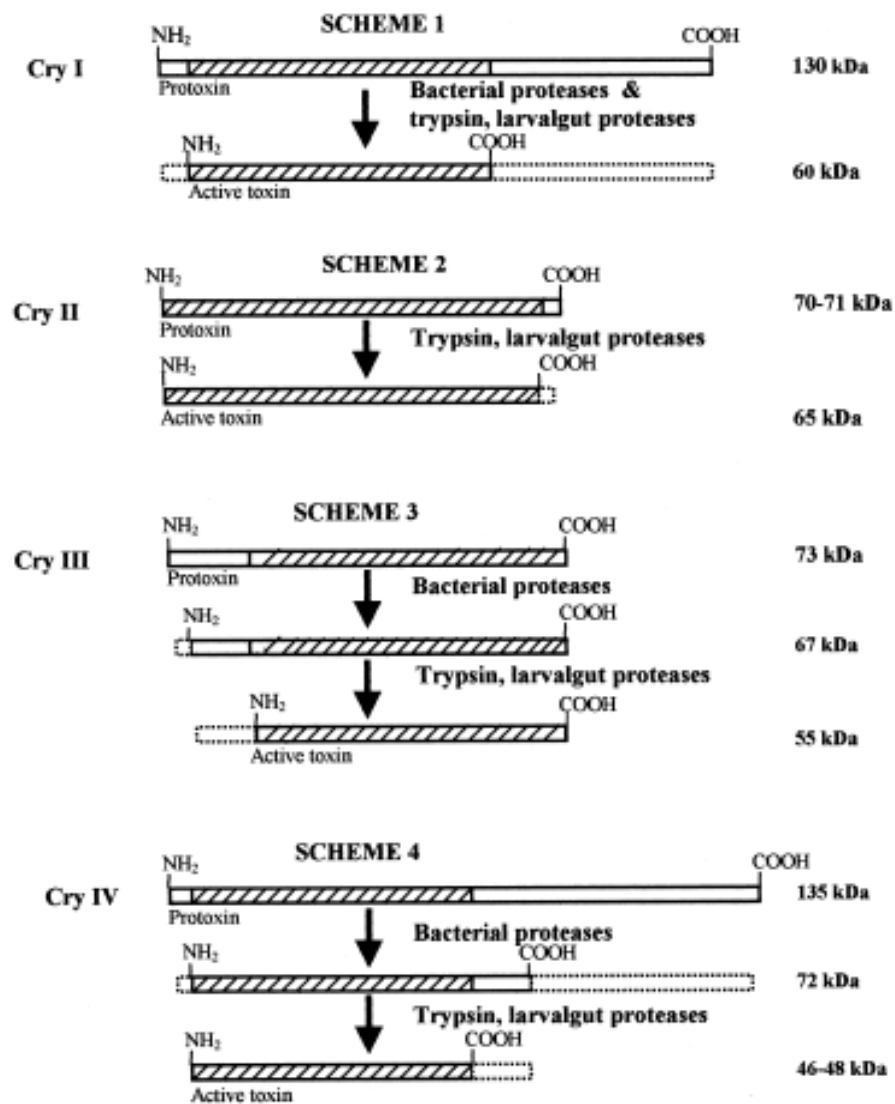
4. Gamma-exotoxin (γ -exotoxin) เป็นสารพิษที่ไม่ทนความร้อน สลายตัวได้ง่ายเมื่อสัมผัสอากาศ ออกซิเจน และแสงแดด พบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส สารพิษนี้จะสลายตัวภายใน 10-15 นาที กลไกในการเข้าทำลายแมลงยังไม่เป็นที่รู้แน่ชัด (ทิพย์วดี, 2535)

5. Louse-factor พบโดย Gingrich ในเหาที่อาศัยอยู่กับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 4 ชนิด คือ *Bovicola bovis*, *B. crassipes*, *B. limbata* และ *B. ovis* (Heimpel, 1963) ที่แสดงอาการผิดปกติเมื่อได้รับ *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) ซึ่งเป็น *B. thuringiensis*. ที่ไม่สร้าง exotoxin และพบว่า อาการผิดปกติไม่ได้เกิดจาก endotoxin จึงได้รายงานว่าเป็นสารพิษอีกชนิดหนึ่งที่ *B. thuringiensis* สร้างขึ้น และให้ชื่อสารนี้ว่า louse factor (ทิพย์วดี, 2535) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ (exo-enzymes) พวก Phospholipid C, Chitinase เป็นตัวช่วยส่งเสริมให้การเข้าทำลายดีขึ้น

6. Vegetative Insecticidal Proteins (VIPs) เป็นสารพิษที่สร้างขึ้นในระยะ vegetative growth ไม่ได้รวมตัวกันเป็นผลึกโปรตีนและมีการปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ เช่น Vip3A (Nunez-Valdez, 1997) มีฤทธิ์ต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera เช่น หนอนกระทู้ดำ (*Agrotis ipsilon*) หนอนกระทู้ฝ้าย (*Spodoptera frugiperda*) หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) หนอนเจาะขอดยาสูบ (*Heliothis virescens*) และหนอนเจาะฝักข้าวโพด (*Helicoverpa zea*) เป็นต้น (Estruch *et al.*, 1996)

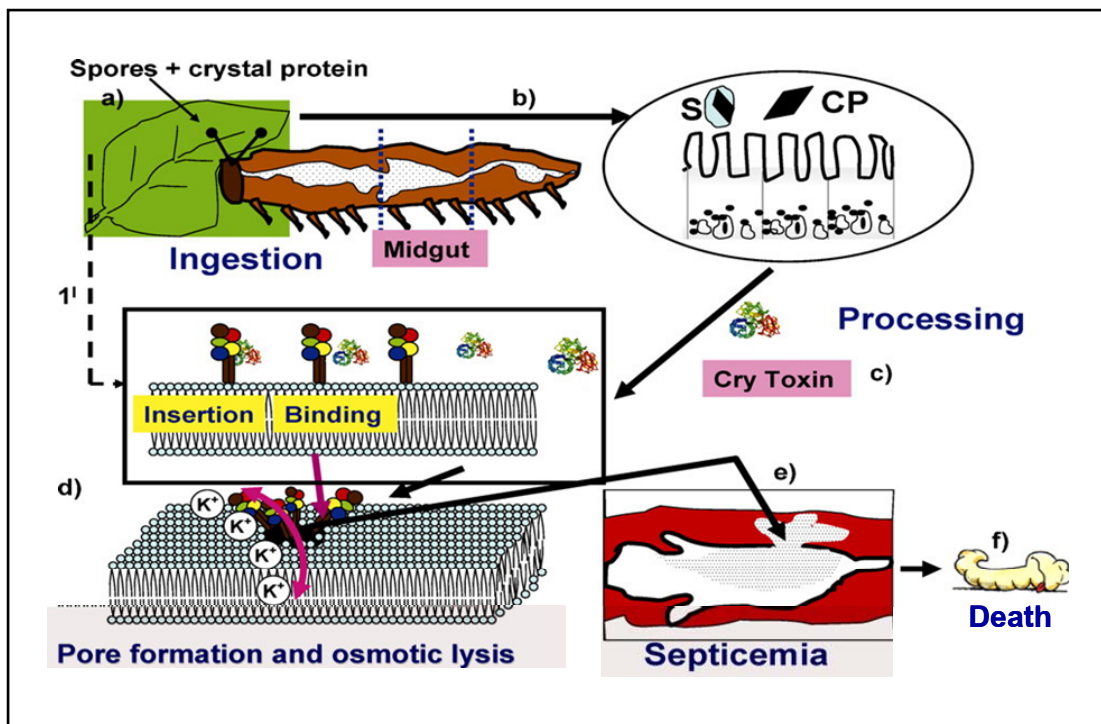
1.6 กลไกการเข้าทำลายแมลงของ *Bacillus thuringiensis*

เมื่อแมลงได้รับสปอร์และผลึกโปรตีนเข้าไปในกระเพาะอาหาร ซึ่งลอยตัวอยู่ในช่องว่างลำตัวของแมลงและมีเลือดไหลเวียนอยู่โดยรอบ สภาพความเป็นด่างภายในกระเพาะอาหาร ส่วนกลางของแมลงจะทำให้ผลึกโปรตีนละลาย (solubilization) และแตกตัว (activation) ออกเป็น protoxin ขนาด 27-160 กิโลดาลตัน และเอนไซม์ protease ที่อยู่ในกระเพาะอาหารส่วนกลางจะตัด protoxin ออกมาอยู่ในรูปของสารพิษ (active toxin) ขนาด 30-65 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 5) ที่เรียกว่า *Bt* Toxins, Delta-endotoxins หรือ Insecticidal crystal proteins (ICPs) (Khetan, 2001) จากนั้นสารพิษจะเข้าจับกับ receptor (receptor binding) บนเซลล์ที่มีความจำเพาะเจาะจงบริเวณผนังเซลล์ของเยื่อกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลง (epithelium membrane) และแทรกเข้าทำลายเยื่อกระเพาะอาหารให้เป็นช่องว่าง (pore formation) (Warren *et al.*, 1984; Aronson *et al.*, 1991; Honée and Visser, 1993) เกิดการซึมผ่านเข้าออกของสารในกระเพาะอาหารส่วนกลางและช่องว่างลำตัวของแมลง ทำให้สภาพในกระเพาะอาหารปกติที่เป็นด่างมี pH ต่ำลง และในเลือดซึ่งปกติเป็นกรดเล็กน้อยจะมี pH เพิ่มขึ้น ส่งผลให้สมดุลร่างกายของแมลงเปลี่ยนไป ระบบทางเดินอาหารของแมลงจะค่อยๆ เป็นอัมพาต แมลงหยุดกินอาหารและจะตายในที่สุด ผลึกโปรตีนจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้แมลงตายหลังจากได้รับ *B. thuringiensis* (Luthy and Wolfersberger, 2000) ในขณะเดียวกันสปอร์ที่แมลงได้รับเข้าไปพร้อมๆ กับผลึกโปรตีนจะผ่านช่องว่างของกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลงเข้าไปในกระแสเลือด และจะเจริญขยายพันธุ์ในเลือด ทำให้แมลงเกิดอาการโลหิตเป็นพิษ (septicemia) ซึ่งเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้แมลงตาย (ภาพที่ 6) (Burgess and Jones, 1998; Whalon and Wingerd, 2003)



ภาพที่ 5 แผนผังแสดงการตัด Cry protoxin ด้วยเอนไซม์ proteases ในกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลง

ที่มา: Rukmini *et al.* (2000)



ภาพที่ 6 กลไกการเข้าทำลายแมลงของ *Bacillus thuringiensis*

a) แมลงได้รับสปอร์และผลึกโปรตีนของ *B. thuringiensis* เข้าไปในกระเพาะอาหารส่วนกลาง (midgut) b) สภาพความเป็นด่างภายในกระเพาะอาหารของแมลงจะทำให้ผลึกโปรตีนละลายเป็น protoxin c) เอนไซม์ protease ภายในกระเพาะอาหารจะย่อย protoxin ให้อยู่ในรูปของสารพิษ (active toxin) จากนั้นสารพิษจะเข้าจับกับ receptor ที่มีความจำเพาะเจาะจงบนเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร (epithelium) และแทรกเข้าไปในเซลล์ ทำให้เยื่อบุกระเพาะอาหารเกิดเป็นช่องว่าง d) สารพิษเข้าไปรบกวนระบบ ionic pump เกิดการแลกเปลี่ยนไอออนของสารระหว่างภายในและภายนอกกระเพาะอาหาร e) กระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลงถูกทำลาย สปอร์เจริญและขยายเพิ่มปริมาณในระบบไหลเวียนโลหิต ทำให้แมลงแสดงอาการโลหิตเป็นพิษ (septicemia) f) จากกลไกทั้งหมดจึงทำให้แมลงตาย 1' เป็นขั้นตอนที่ผลึกโปรตีนได้ถูกย่อยให้อยู่ในรูปของสารพิษและสามารถเข้าไปจับกับ receptor โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอน b) และ c)

ที่มา: Brar *et al.* (2007)

1.7 กลไกของ *Bacillus thuringiensis* ที่ทำให้เกิดโรคต่อแมลง

B. thuringiensis ทำให้เกิดโรคกับแมลงหลายชนิด ความอ่อนแอของแมลงที่มีต่อ *B. thuringiensis* นั้นขึ้นอยู่กับ ชนิด อายุ ความแข็งแรงของแมลง และสภาพแวดล้อมต่างๆ ส่วนความเป็นพิษของ *B. thuringiensis* ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อายุ สภาวะการเพาะเลี้ยง และอัตราส่วนระหว่างสปอร์และผลึกโปรตีนที่แมลงได้รับ แมลงจะเกิดโรคได้ก็ต่อเมื่อกินสปอร์และผลึกโปรตีนเข้าไป โดย *B. thuringiensis* มีกลไกการทำให้เกิดโรคต่อแมลงแบ่งออกเป็น 2 ประการหลัก คือ

1. ทำให้เกิดอัมพาตทั่วตัว (general paralysis) ส่วนใหญ่เป็นสาเหตุที่ทำให้แมลงตาย แมลงจะเป็นอัมพาตอย่างรวดเร็วหลังจากที่ได้รับ *B. thuringiensis* เนื่องจากผลึกโปรตีนหรือ Delta-endotoxin ไปทำลายผนังกระเพาะอาหารส่วนกลางเกิดเป็นช่องว่าง ทำให้มีการซึมผ่านเข้าออกของสารในกระเพาะอาหารและระบบไหลเวียนเลือด เกิดความไม่สมดุลของระดับโพแทสเซียมไอออน (K^+) สภาพ pH ในกระเพาะอาหารจากปกติประมาณ 10.2-10.5 จะลดต่ำลง และในเลือดจากปกติประมาณ 6.8 จะเพิ่มมากขึ้น การเพิ่มขึ้นของ pH ในเลือดทำให้แมลงหยุดกินอาหาร เคลื่อนไหวเชื่องช้า เกิดอาการเป็นอัมพาตทั่วตัวอย่างรวดเร็วและรุนแรง (ทิพย์วดี, 2535) จากตัวอย่างหนอนไหม (*Bombyx mori*) ที่ได้รับ Delta-endotoxin พบว่าหนอนจะเป็นอัมพาตอย่างรวดเร็ว เนื่องจากค่า pH ในเลือดเพิ่มขึ้น (Heimpel and Angus, 1959) โดยเมื่อค่า pH และปริมาณ K^+ ในเลือดสูง แมลงเริ่มหยุดการเคลื่อนไหวและหยุดกินอาหาร มีอาการอาเจียนและท้องร่วง จากนั้นจะเกิดอัมพาตทั่วตัว หัวใจหยุดเต้นและตาย โดยมีจุดสีดำเกิดขึ้นที่ผนังลำตัวและกระเพาะส่วนกลางของแมลง (Nishiitsutsuji-Uwo and Endo, 1980)

2. ทำให้เกิดอัมพาตที่กระเพาะอาหาร (gut paralysis) กระเพาะอาหารของแมลงจะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว หลังจากได้รับ Delta-endotoxin โดยค่า pH ในเลือดไม่มีการเปลี่ยนแปลงและไม่มีการเป็นอัมพาตทั่วตัว (Heimpel and Angus, 1959) แมลงหยุดกินอาหาร อาเจียน ท้องเสีย และตายภายใน 24 - 48 ชั่วโมง แต่ถ้าแมลงได้รับพิษน้อย จะทำให้สามารถกลับมาใช้ชีวิตปกติภายใน 1-2 วัน หลังจากได้รับผลึกโปรตีนเข้าไป (Burgess and Hussey, 1971)

นอกจากนี้ยังมีแมลงบางชนิดอ่อนแอต่อ exotoxin ซึ่งเป็นสารพิษที่ *B. thuringiensis* สร้างขึ้น ในขณะที่เซลล์มีการเจริญและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ทำให้แมลงตายอย่างรวดเร็วด้วยอาการที่เรียกว่า toxemia (Knowles, 1994) โดยไปขัดขวางการทำงานของระบบสรีรวิทยาในตัวแมลง ทำให้

แมลงเตียบโตเข้า ไม่เข้าคักแต่หรือคักแต่ออกเป็นตัวเต็มวัยไม่สมบูรณ์ วงจรชีวิตสั้น และไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ (จริยา และคณะ, 2547) ลักษณะโดยทั่วไปของแมลงภายหลังได้รับ *B. thuringiensis* จะมีการเคลื่อนไหวช้าลง หรือหยุดเคลื่อนไหว ไม่กินอาหารและสํารอกอาหารออกมา อวัยวะต่างๆ ถูกทำลาย เมื่อแมลงตายแล้วลำตัวจะมีสีเข้มขึ้นเป็นสีน้ำตาลหรือดำ ลำตัวอ่อนนุ่ม รูปร่างไม่คงที่ อวัยวะภายในเหลวและมีกลิ่นเหม็น

2. *Bacillus thuringiensis* JC590

B. thuringiensis JC590 เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่รวบรวมจากเขตป่าสมบูรณ์ บริเวณน้ำตกวังเหว อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ อ.นาดี จ.ปราจีนบุรี เมื่อตรวจสอบสายพันธุ์โดยวิธีทางซีรัมวิทยา (H-serotype) พบว่าเป็นสายพันธุ์ *kurstaki* (H3abc) ที่มีผลึกโปรตีนคล้ายรูปปิรามิดคู่ฐานขนกัน (จริยา และคณะ, 2544) เยาวลักษณ์ (2548) และ Poojitkanont *et al.* (2008) ได้ศึกษาชนิดและตำแหน่งของยีน *cry* ที่มีผลต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera พบว่า มียีน *cry* 1A(b) *cry* 1C *cry* 1D *cry* 1E *cry* 1I และ *cry* 2A ตามลำดับ ซึ่งยีนทั้งหมดนี้อยู่บนโครโมโซมและพลาสมิด ในขณะที่ผลการทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ เรือนปลูกพืชทดลอง และแปลงปลูกผักคะน้าของเกษตรกรในรูปเชื้อสด พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมหนอนใยผัก (*Plutella xylostella* L.) โดยมีค่าความเข้มข้นที่ทำให้หนอนใยผักตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) เท่ากับ 4.47×10^3 spores/ml (จริยา และคณะ, 2544) จึงเหมาะต่อการนำมาพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ให้มากขึ้น

ต่อมาอุษณีย์ (2549) ได้ศึกษากระบวนการผลิตและการพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ โดยใช้วัสดุและสารปรุงแต่งชนิดต่างๆ ที่มีคุณสมบัติช่วยให้ประสิทธิภาพคงอยู่ได้เป็นเวลานาน สามารถหาได้ง่ายและมีต้นทุนต่ำ เช่น น้ำอามิ-อามิ กากน้ำตาล น้ำมันปาล์ม ไข่แดง เป็นต้น พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำอามิ-อามิ 5 เปอร์เซ็นต์ จะให้อัตราการเติบโตของเซลล์สูงสุด และเมื่อนำมาปรุงแต่งเป็นผลิตภัณฑ์ สูตรผลิตภัณฑ์ปรุงแต่งที่ประกอบด้วยเซลล์ *B. thuringiensis* JC590 เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก กากน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำมันปาล์ม 45 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำตาลแล็กโทส 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ไข่แดง 11.25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และน้ำกลั่น 26 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษาน้อยที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมดสูงสุดหลังทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน และจากสูตรผลิตภัณฑ์ดังกล่าว จริยา และคณะ (2550) ได้นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูผักที่สำคัญ 3 ชนิด ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ หนอนใยผัก (*Plutella xylostella*)

หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) และหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) พบว่าเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้อง มีค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ทำให้หนอนตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) เท่ากับ 2.44×10^7 , 7.96×10^7 และ 13.10×10^7 cfu/ml ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส มีค่า LC_{50} เท่ากับ 11.60×10^7 , 3.93×10^7 และ 10.00×10^7 cfu/ml ตามลำดับ และพบว่าอัตราส่วนของสารปรุงแต่งที่เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์มีผลต่อการเก็บรักษาและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

3. ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis เป็นสารชีวภัณฑ์ตัวหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในแปลงผัก ฝักและผลไม้ แต่การใช้ผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ในช่วงแรกไม่ประสบความสำเร็จเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี เนื่องจากมีปัญหาหลายอย่าง เช่น มาตรฐานความแรงของสารออกฤทธิ์ (potency) จะขึ้นอยู่กับจำนวนสปอร์ ประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชของ *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ส่วนใหญ่มีค่าต่ำ และในผลิตภัณฑ์ที่มี exotoxin ซึ่งเป็นสารพิษที่สามารถทำลายเซลล์เม็ดเลือด (hemolysin) (Beegle and Yamamoto, 1992) จนกระทั่งในช่วงปี ค.ศ.1970 มีการค้นพบ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* สายพันธุ์ HD-1 ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมหนอนผีเสื้อศัตรูพืชทางการเกษตรและป่าไม้ที่สามารถแข่งขันกับสารเคมีกำจัดแมลงได้ (Lisansky et al., 1993) ทำให้มีบริษัทต่างๆ ใช้เป็นตัวพื้นฐานสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ มากขึ้น เช่น บริษัท Abbott Laboratories และบริษัท Sandoz Corporation ผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีชื่อทางการค้าว่า Dipel® และ Thuricide® จาก *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* สายพันธุ์ HD-1 (H3a3b) เพื่อควบคุมหนอนผีเสื้อ เช่น หนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) หนอนก๊ิบกะหล่ำ (*Tricoplusia ni*) หนอนเจาะยาสูบ (*Manduca sexta*) หนอนผีเสื้อยิบซี (*Lymantria dispar*) และหนอนเจาะยอดสน (*Choristoneura fumiferana*) เป็นต้น โดยได้มีการนำผลิตภัณฑ์จาก *B. thuringiensis* สายพันธุ์นี้ไปใช้ในการควบคุมหนอนเจาะยอดสนและหนอนผีเสื้อยิบซีในอเมริกาเหนือ คิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ ของผลิตภัณฑ์ที่มีขายทั่วโลก (Lewis et al., 1974)

นอกจากนี้เมื่อมีการค้นพบ *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (H-14) สำหรับใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุงและตัวอ่อนของริ้นดำ ซึ่งเป็นพาหะนำโรคเท้าช้าง (filariasis) นับว่าเป็นความสำเร็จที่เด่นชัดในการร่วมมือระหว่างภาคอุตสาหกรรมกับองค์กรของรัฐคือ Onchocerciasis Control Programme ขององค์การอนามัยโลก (WHO) ที่มีการนำ *B. thuringiensis* สายพันธุ์นี้มาใช้

ในการควบคุมแมลงได้มากถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Lacey and Undeen, 1986) ต่อมาในช่วงต้นปี ค.ศ. 1980 บริษัท Abbott Laboratories และบริษัท Sandoz Corporation (ปัจจุบันทั้งสองบริษัทรวมกิจการเป็นบริษัท Valent BioScience) ได้นำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีชื่อทางการค้าว่า VectoBac® และ Teknar® (Federici, 2005) จนกระทั่งปี ค.ศ.1990 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* หรือ *B. thuringiensis* subsp. *san diego* ถูกนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าเพื่อใช้ควบคุมตัวอ่อนของด้วง Colorado potato beetle (Chilcott and Wigley, 1994) แต่ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากในขณะนั้นมีสารเคมีชนิดใหม่สำหรับใช้ในการควบคุมตัวอ่อนของด้วงที่มีประสิทธิภาพและราคาถูกกว่า (Federici, 2005) โดยเมื่อปี ค.ศ.1995 มีผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ที่ขึ้นทะเบียนกับ The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) ทั้งหมด 182 รายการ และจากการสำรวจในปี ค.ศ.1999 พบว่าผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ที่ขายในท้องตลาดมีน้อยกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับสารเคมีกำจัดแมลงทั้งหมด (ตารางที่ 1) และคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ของสารชีวภัณฑ์ที่มีขายทั้งหมด (Carpenter and Gianessi, 2001; EPA, 2001) และคาดว่าจะมีการใช้ผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* เพิ่มขึ้น เนื่องจากแมลงศัตรูพืชเกิดการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงมากขึ้น โดย Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) ได้คาดการณ์ไว้ว่า ในปี ค.ศ. 2020 ตลาดของสารชีวภัณฑ์จะเติบโตขึ้น 20 เปอร์เซ็นต์ ของตลาดสารกำจัดศัตรูพืชทั่วโลก (Whalon and Wingerd, 2003)

ตารางที่ 1 รายชื่อผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

Bt subspecies	Strain	Product name	Company	Target insect ^{1/}
<i>kurstaki</i>				
	-	Forey	Valent Bioscience Co.	Lepidopteran
	-	Biobit	Valent Bioscience Co.	Lepidopteran
	BMP123	BMP123	Becker Microbial Products, Inc.	Lepidopteran
	EG2348	Condor	Ecogen Inc.	Lepidopteran
	EG2371	Cutlass	Ecogen Inc.	Lepidopteran
	ABTS-351	Dipel	Valent Bioscience Co.	Lepidopteran
	EG7481	Crymax	Ecogen Inc.	Lepidopteran
	EG7826	Lepinox	Ecogen Inc.	Lepidopteran
	SA-11	Javelin	Certis USA	Lepidopteran
	SA-12	Thuricide	Certis USA	Lepidopteran
<i>aizawai</i>				
	GC-91	Agree	Certis USA	DBM, AW
	NB200	Florbac	Valent Bioscience Co.	DBM, AW
	ABTS	XenTari	Valent Bioscience Co.	DBM, AW
	NT0423	Tobagg	Dongbu Hannong Chemicals	DBM, AW
	GB413	Solbichae	Green Biotech Co.	DBM, AW
<i>israelensis</i>				
	-	Gnatrol	Valent Bioscience Co.	Mushroom fly
	-	Bactimos	Valent Bioscience Co.	Mosquito & BF
	AM-65-52	VectoBac	Valent Bioscience Co.	Mosquito & BF
	SA3A	Teknar	Valent Bioscience Co.	Mosquito & BF
	BMP 144	BMP	Becker Microbial Products, Inc.	Mosquito & BF
<i>tenebrionis</i>				
	NB-176	Novodor	Valent Bioscience Co.	CPB, ELB

หมายเหตุ ^{1/} DMB, Diamond back moth (หนอนใยผัก); AW, army worm (หนอนกระทู้);

BF, black fly (ริ้นดำ); CPB, Colorado potato beetle; ELB, elm leaf beetle

ที่มา: Roh *et al.* (2007)

ผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* จะประกอบด้วยผลึกโปรตีนและสปอร์ที่เป็นพิษกับแมลง (Bernhard and Utz, 1993) นอกจากนี้สูตรหรือรูปแบบของผลิตภัณฑ์กัณฑ์ (formulation) ก็นับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความสำเร็จในการนำจุลินทรีย์ไปใช้ควบคุมศัตรูพืช เนื่องจากอาจมีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เช่น ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความเสถียรหรือมีความคงตัว (stability) ในระหว่างการเก็บรักษา (shelf life) โดยยังคงมีชีวิตอยู่จนกว่าจะนำไปใช้ มีผลต่อความสามารถและประสิทธิภาพในการควบคุมศัตรูพืช มีความสะดวกในการนำผลิตภัณฑ์ไปใช้ เป็นต้น (Lisansky, 1985) ซึ่ง Jones and Burges (1998) ได้ให้ข้อควรคำนึงในการปรุงแต่งสูตรผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์รูปแบบต่างๆ คือ 1) จุลินทรีย์ต้องยังคงอยู่ได้ในระหว่างกระบวนการผลิต การขนย้าย และการเก็บรักษา 2) รูปแบบของผลิตภัณฑ์มีความเหมาะสม ช่วยให้การเคลื่อนย้ายและการนำไปใช้มีความสะดวกสามารถเข้าถึงเป้าหมายได้ง่าย 3) สามารถป้องกันจุลินทรีย์จากปัจจัยแวดล้อมต่างๆ ในบริเวณพื้นที่ที่นำไปใช้และเพิ่มความคงทนให้สามารถอยู่ได้นานยิ่งขึ้น 4) เพิ่มกิจกรรมของจุลินทรีย์ในพื้นที่เป้าหมาย โดยมีการเพิ่มปริมาณ กิจกรรม การสัมผัส และความสัมพันธ์กับศัตรูเป้าหมาย

3.1 การเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis*

การเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* ให้ได้ปริมาณมากๆ จะอาศัยกระบวนการหมัก (fermentation process) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้ 3 ลักษณะ คือ การเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch culture) การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture) และการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (fed-batch culture) (คุษณี, 2537) วัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* เพื่อต้องการให้มีอัตราการผลิตเซลล์และสปอร์สูง ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ จึงมีส่วนประกอบของแร่ธาตุต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในอัตราส่วนที่เหมาะสม ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอัตราส่วนของน้ำตาลสูง จะได้ปริมาณเซลล์มาก โดยที่การสร้างสปอร์มีเพียงเล็กน้อยหรืออาจไม่มีเลย (ปทุมพร และจรียา, 2541) ปัจจุบันงานวิจัยส่วนใหญ่ให้ความสำคัญกับการเลือกวัตถุดิบที่มีต้นทุนต่ำ เพื่อนำมาใช้แทนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีราคาสูง สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจึงมีความหลากหลาย ส่วนใหญ่แล้วจะเลือกใช้วัสดุทางการเกษตร และวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรม โดยมีการควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิประมาณ 27-33 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเพาะเลี้ยงตลอดการหมักประมาณ 6.5-7.5 สำหรับในถังหมักขนาดเล็กอัตราการให้อากาศประมาณ 1.0 vvm (ปริมาตรของอากาศในถังหมัก/ปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยง/นาที่) และอัตราการกวนของใบพัดประมาณ 600-800 รอบต่อนาที (Quinlan and Lisansky, 1983) และนิยมใช้สารป้องกันการ

เกิดฟองคือ silicone และ polypropylene glycol หรืออาจใช้ใบพัดตีฟองให้แตกควบคู่กันไปด้วย (ประสิทธิ์, 2541) ในระหว่างกระบวนการหมัก *B. thuringiensis* จะเพิ่มจำนวนเซลล์ในระยะ vegetative growth ซึ่งใช้ระยะเวลาตั้งแต่ 0-10 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อส่วนประกอบต่างๆ ในสารอาหารถูกนำไปใช้หมด เซลล์จะเข้าสู่ระยะการสร้างสปอร์ (sporulation) และผลิตโปรตีน โดยจะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10-20 (Taborsky, 1992) เมื่อกระบวนการหมักสิ้นสุดลง น้ำหมักที่ได้จากการหมัก *B. thuringiensis* จะประกอบด้วยเซลล์ สปอร์ ผลิตโปรตีน เอนไซม์ และของแข็งอื่นๆ ที่ตกค้างอยู่ และจะนำไปผ่านกระบวนการแยกองค์ประกอบทั้งหมดออกจากน้ำหมักเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในขั้นตอนของการปรุงแต่งสารต่อไป (Rowe and Margaritis, 2004)

3.2 การปรุงแต่งสูตรผลิตภัณฑ์

รูปแบบของผลิตภัณฑ์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ควบคุมแมลงศัตรูมีความหลากหลายมากทั้งในรูปของเหลวและของแข็ง (GIFAP, 1989) การผลิตจะคำนึงถึงความเหมาะสมและความสะดวกในการนำไปใช้งาน ซึ่ง Rhodes (1993) ได้แบ่งรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากจุลินทรีย์ออกเป็น 2 รูปแบบหลัก คือ ผลิตภัณฑ์รูปน้ำ (liquid formulate) โดยเชื้อจุลินทรีย์จะอยู่ในรูปเซลล์แขวนลอยในตัวทำละลายที่เป็นน้ำหรืออาจอยู่ในตัวทำละลายที่ไม่ละลายน้ำ เช่น น้ำมัน ผลิตภัณฑ์รูปแบบนี้มีความทนทานต่ออุณหภูมิและสารเคมีต่ำ มีอายุการเก็บรักษาสั้นและต้องเก็บรักษาในภาชนะบรรจุพิเศษที่ต้องมีระบบการแลกเปลี่ยนก๊าซและความชื้นที่เหมาะสม (จันทิมา, 2545) ผลิตภัณฑ์จาก *B. thuringiensis* สูตรน้ำมีหลายรูปแบบ เช่น น้ำเข้มข้น (flowable concentrates) อิมัลชัน (emulsions) Oil miscible suspension และ Encapsulations เป็นต้น (Tomlin, 1997) และผลิตภัณฑ์รูปแห้ง (dry formulate) นิยมใช้กับจุลินทรีย์ที่มีการสร้างสปอร์ (Paau, 1988) วิธีการทำแห้งมีหลายวิธี เช่น การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) การทำแห้งแบบใช้อากาศหรือการอบแห้ง (air dry) เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบนี้สะดวกต่อการเก็บรักษาและง่ายต่อการขนส่ง เช่น ฝุ่น (dusts) ผงละลายน้ำ (wetttable powders) เม็ด (granules) และ water dispersible granules เป็นต้น (Tomlin, 1997)

การปรุงแต่งผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* แต่ละสูตรจะมีองค์ประกอบ (formulation component) ที่แตกต่างกัน โดยองค์ประกอบที่สำคัญจะประกอบด้วย (Lisansky *et al.*, 1993)

1. สารออกฤทธิ์ (active ingredient) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมี และคุณสมบัติกายภาพที่มีอิทธิพลต่อการพิจารณาเลือกสารผสมตัวอื่นที่เป็นองค์ประกอบ การผลิตสารออกฤทธิ์จะผลิตในรูปของสารออกฤทธิ์ที่เข้มข้นอาจเป็นของเหลวหรือของแข็ง ในผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* มีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ที่มีความเป็นพิษต่อแมลง คือ ส่วนของสปอร์และผลึกโปรตีนที่แยกได้จากอาหารที่ใช้หมัก (Bernhard and Utz, 1993)

2. สารพา (carrier) ทำหน้าที่เป็นตัวพาเชื้อจุลินทรีย์ให้กระจายอย่างทั่วถึงเมื่อนำผลิตภัณฑ์ไปใช้งาน และช่วยห่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อป้องกันการถูกทำลาย โดยทั่วไปสารพามีลักษณะเป็นสารเฉื่อย (inert carrier)

3. ตัวทำละลาย (solvents) สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ไม่รวมตัวกับน้ำ (immiscibility in water) เช่น น้ำมัน การปรุงแต่งจะต้องเติมสาร emulsifier เพื่อทำให้น้ำมันซึ่งเป็นตัวทำละลายเข้ากับน้ำที่เป็นตัวเจือจางได้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังการปรุงแต่งจะอยู่ในรูปของน้ำมันละลายน้ำ (Emulsifiable Concentration = E.C.) และกลุ่มที่สามารถรวมตัวกับน้ำได้ดี (miscibility in water) เช่น ตัวทำละลาย Isopropanol และ Glycoethers เมื่อปรุงแต่งเสร็จแล้วผลิตภัณฑ์จะอยู่ในรูปของเหลวชั้นละลายน้ำ (Soluble Concentration = S.C.)

4. สารต่อต้านจุลินทรีย์ (anti-microbial agents) เป็นสารที่เติมเพื่อช่วยลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น sorbic acid, propionic acid, crystal violet (Brar *et al.*, 2006)

5. สารลดแรงตึงผิว (surfactants) หรือสารเสริมประสิทธิภาพในการจับใบมีคุณสมบัติคือ ทำให้สารกำจัดแมลงจับที่ผิวใบได้ดีและยังทำให้ละอองของสารที่พ่นออกมาจากหัวฉีดมีขนาดที่สม่ำเสมอ ช่วยลดความสูญเสียของสารที่ไหลลงสู่พื้นดิน (run off) อีกทั้งยังช่วยในการกระจายตัวของสารอีกด้วย (dispersing property) ที่นิยมใช้ เช่น Tween 20, Montanox 80 เป็นต้น

6. สารปรุงแต่งอื่นๆ (additives) เช่น สารช่วยในการคงสภาพ (stabilizers) สารเสริมฤทธิ์ (synergists) สารช่วยในการซึมเปียก (wetters) สารเชื่อม (binder) สารป้องกันเซลล์ (protectant) และสารป้องกันรังสีอุลตราไวโอเล็ต (UV radiation screens) เป็นต้น

3.3 อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

อายุการเก็บรักษาและความคงทนของผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังสิ้นสุดกระบวนการผลิต ไม่ได้ถูกนำไปใช้ทันที ผลิตภัณฑ์ที่ดีจึงต้องมีอายุการเก็บรักษาได้นาน โดยยังคงมีประสิทธิภาพดีในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ทำให้ในการขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ได้มีข้อกำหนดให้ระบุรายละเอียดต่างๆ เกี่ยวกับวันที่ผลิต วันหมดอายุ วิธีการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ วิธีการใช้ และสถานที่ผลิต ลงบนฉลากบรรจุภัณฑ์ด้วย

ปัจจัยที่ส่งผลต่ออายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์มีหลายประการ เช่น รูปแบบของผลิตภัณฑ์ คุณสมบัติขององค์ประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการปรุงแต่ง สภาพและวิธีการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ เป็นต้น ส่วนใหญ่ผลิตภัณฑ์จาก *B. thuringiensis* ในรูปแบบน้ำจะมีความคงทนต่ำกว่าแบบแห้ง โดยมีอายุการเก็บรักษาประมาณ 1 ปี แต่มีข้อดีคือมีอัตราการกลับมาเจริญได้ใหม่สูงและมีต้นทุนในการผลิตต่ำ (Ziwen, 2002) มีรายงานการวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับอายุการเก็บรักษาและความคงทนของผลิตภัณฑ์ เช่น Tamez-Guerra *et al.* (1999) ได้รายงานผลการปรุงแต่งสูตรผลิตภัณฑ์แบบ microgranule จาก *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* ด้วยแป้งข้าวโพด น้ำมันพืช ผงน้ำตาล 2-propanol สี malachite green และ formaldehyde พบว่าสามารถควบคุมด้วงถั่วแม็กซิกัน (*Epilachna varivestis*) ในแปลงปลูกได้ดีกว่าเชื้อสด และมีกิจกรรมสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 24 เดือน และ Brar *et al.* (2005) ได้ศึกษาความคงทนของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* สูตรน้ำ ที่ได้จากการหมักโดยใช้ของเหลือจากอุตสาหกรรมแป้ง พบว่าผลิตภัณฑ์สูตรที่มี pH 6 และ 6.5 มีค่าความเป็นพิษกับแมลงลดลง หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี นอกจากนี้ Lacey (1985) ได้ศึกษาถึงระดับ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ในสารแขวนลอย *B. thuringiensis* พบว่าที่ระดับ pH เป็นกลางและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะช่วยในการเก็บรักษากิจกรรมและจำนวนสปอร์ของ *B. thuringiensis* ได้ดีที่สุดนาน 308 วัน

4. แมลงศัตรูพืช

แมลงสามารถทำลายพืชได้เกือบทุกชนิดทั้งโดยการกัดกินส่วนต่างๆ ของพืช ดูดกินน้ำเลี้ยง และการเป็นพาหะนำเชื้อโรคต่างๆ เข้าสู่พืช ทำให้พืชจำนวนมากเสียหายจากการเข้าทำลายโดยตรง และจากเชื้อโรคพืชที่มีแมลงเป็นพาหะ การทำลายของแมลงเป็นสาเหตุให้ผลผลิตของพืชทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพลดลง (ศานิต, 2546) ความเสียหายของพืชที่เกิดจากแมลงนั้น มีสาเหตุมาจากการกัดกินของหนอนผีเสื้อถึง 80 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะพืชผัก เช่น พืชตระกูลกะหล่ำ ตระกูลแตง มะเขือเทศ พริก ถั่วฝักยาว หน่อไม้ฝรั่ง มันฝรั่ง และหอมหัวใหญ่ เป็นต้น (Kuroko and Lewvanich, 1993) หนอนผีเสื้อที่เป็นศัตรูสำคัญของพืชเศรษฐกิจมีหลายชนิด เช่น หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม หนอนกีบกะหล่ำ และหนอนชอนใบ เป็นต้น โดยเฉพาะหนอนกระทู้ผักเป็นแมลงศัตรูสำคัญชนิดหนึ่งที่สามารถทำลายพืชผักเกือบทุกชนิด

หนอนกระทู้ผัก

ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Spodoptera litura</i> (Fabricius)
ชื่อสามัญภาษาอังกฤษ	Common cutworm, Leaf-eating caterpillar, Tobacco cutworm, Cotton leafworm
ชื่อสามัญภาษาไทย	หนอนกระทู้ผัก หนอนรัง หนอนกระทู้ฝ้าย หนอนกระทู้ยาสูบ
วงศ์	Noctuidae
อันดับ	Lepidoptera

4.1 ความสำคัญและลักษณะการทำลาย

หนอนกระทู้ผักเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งในประเทศไทย เนื่องจากหนอนชนิดนี้มีพืชอาหารหลายชนิด และเป็นศัตรูที่สำคัญของพืชผัก ไม้ดอก ไม้ประดับ ฝ้าย และยาสูบ (Kuroko and Lewvanich, 1993; Bin-Cheng Zhang, 1994; Howse *et al.*, 1998) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีชื่อสามัญได้หลายชื่อ เช่น หนอนกระทู้ยาสูบ (Tobacco cutworm), หนอนกระทู้ฝ้าย (Cotton leafworm) และหนอนรัง (Cluster caterpillar) เป็นต้น (Kononenko, 1990; Kuroko and Lewvanich, 1993) สามารถขยายพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี ทำให้ระบาดตลอดทั้งปีและพบว่าระบาดอยู่ทั่วทุกภาคของ

ประเทศไทย โดยจะเริ่มทำลายพืชตั้งแต่ฟักออกจากไข่ ในระยะแรกหนอนจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มแทะกินผิวใบจนบางใสเหลือแต่เส้นใบ เมื่อหนอนโตขึ้น จะเริ่มทำลายรุนแรงขึ้น อัตราการกินอาหารจะเพิ่มขึ้นตามวัยของหนอน ซึ่งสามารถกัดกินได้ทุกส่วนของพืชทั้งใบ ก้าน ดอก หรือส่วนอื่นๆ (สิริวัฒน์, 2526) ทำความเสียหายให้กับพืชเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นหนอนที่มีขนาดใหญ่ และแพร่ระบาดได้รวดเร็ว โดยมักจะพบบ่อยในช่วงฤดูฝน (ภัทรภรณ์, 2536)

4.2 รูปร่างลักษณะและวงจรชีวิต (กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ, 2542)

ระยะไข่ หลังจากผสมพันธุ์หนอนกระทู้ผักตัวเมียจะวางไข่ในเวลากลางคืนของวันรุ่งขึ้น โดยวางไข่เป็นกลุ่มๆ ไข่ใบพืช กลุ่มไข่มีขนสีน้ำตาลอ่อนคลุมบาง ๆ ในแต่ละกลุ่มถูกวางเรียงกันอย่างมีระเบียบเป็นชั้นๆ ลักษณะไข่เป็นรูปครึ่งวงกลมแบบผ่าซีกว่า มีลายเส้นบางใสเป็นรัศมีโดยรอบ (ณรรฐพล, ม.ป.ป.) เส้นผ่าศูนย์กลางของไข่แต่ละฟองประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ตัวเมียหนึ่งตัวจะวางไข่ได้ 4-6 กลุ่ม โดยวางในวันแรก 2-3 กลุ่ม และในวันต่อๆ มาอีก 3 วัน วันละ 1-2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีไข่ประมาณ 100-300 ฟอง บนกลุ่มไข่จะมีขนสีฟางขาวปกคลุมอยู่ ตัวเมียหนึ่ง ๆ จะวางไข่ได้ 1,000-2,000 ฟอง (อุดมพร, 2528) ไข่ที่เริ่มวางใหม่ๆ มีสีเหลืองอ่อน วันถัดมาไข่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลือง และในวันที่ 3 ซึ่งเป็นวันที่ไข่จะฟักออกเป็นตัวหนอน ไข่จะมีสีดำจางๆ สีดำที่เกิดขึ้นนี้เป็นสีของกะโหลกศีรษะและขนของตัวอ่อนที่อยู่ในไข่ เมื่อครบกำหนดตัวอ่อนจะกัดเปลือกไข่เป็นวงเกือบรอบเปลือกแล้วใช้ศีรษะมุดออกมา ก่อน ไข่ส่วนใหญ่จะฟักในเวลา กลางวัน ระยะไข่ 3-4 วัน

ระยะหนอน หนอนมีการเจริญเติบโต 5 ระยะ โดยหนอนที่เพิ่งฟักออกจากไข่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มบนใบพืช มีขนาดลำตัวเล็กความยาวประมาณ 1.5 มิลลิเมตร จะมีสีเขียวอ่อนหรือสีน้ำตาล หัวสีดำ หนอนเป็นแบบ eruciform เมื่อหนอนโตขึ้นจะมีลำตัวอ้วนป้อม ผิวเรียบคล้ายหนอนกระทู้หอมแต่แถบสีขาวข้างลำตัวเห็นไม่ชัด มักสังเกตเห็นจุดสีดำขนาดใหญ่ตรงปล้องที่ 3 ของส่วนหัว (ภัทรภรณ์, 2536) และเริ่มแยกย้ายไปยังส่วนอื่นๆ ของต้นพืช หลังจากพ้นวัยที่ 2 หนอนโตเต็มที่มีขนาด 3-4 เซนติเมตร จะสังเกตเห็นแถบสีดำที่คอชัดเจน ลำตัวเปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนเกิดลายเส้นหรือจุดสีดำ บางครั้งมีสีเกมเทา มักมีจุดสีดำพาดตามยาวของลำตัว เคลื่อนไหวช้า ส่วนมากในตอนกลางวันอากาศร้อนหนอนจะทิ้งตัวลงไปอาศัยตามรอยแตกของดินบริเวณโคนต้น และจะขึ้นมากัดทำลายพืชในเวลากลางคืน เมื่อหนอนเจริญเติบโตเต็มที่ หนอนจะหยุดกินอาหารและเข้าดักแด้ในดินตามรอยแตกหรือกองเศษพืชลึกประมาณ 1.5 เซนติเมตร ระยะหนอน 10-14 วัน

ระยะดักแด้ ดักแด้เป็นแบบ oblect ในระยะแรกดักแด้จะมีสีน้ำตาลอ่อน เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มจนเกือบสีดำ มีความยาวประมาณ 1.5-1.8 เซนติเมตร ระยะดักแด้ 7-10 วัน (ณรรฐพล, ม.ป.ป.)

ระยะตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง เมื่อกางปีกจะกว้างประมาณ 3-3.5 เซนติเมตร ลำตัวยาว 1.5 เซนติเมตร เมื่อเกาะนิ่งอยู่กับที่จะหุบปีกเป็นรูปหลังคา ปีกคู่หน้ามีสีน้ำตาลเข้มมีลวดลายเต็มปีก ส่วนปีกคู่หลังมีสีขาวบาง ปีกมีขนปกคลุมเป็นจำนวนมาก ลำตัวมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุมอยู่โดยเฉพาะด้านล่างของส่วนอก เมื่อออกเป็นตัวเต็มวัย 1-2 วัน จะออกบินและผสมพันธุ์ในเวลากลางคืน หลังจากผสมพันธุ์แล้วตัวเมียจะวางไข่ในเวลากลางคืนของวันรุ่งขึ้น ส่วนในเวลากลางวันมักพบตามกอหญ้า รอยแตกของดิน หรือร่องไม้ในร่ม ตัวเต็มวัยมีอายุ 7-10 วัน รวมระยะเวลาดตลอดวงจรชีวิตประมาณ 27-38 วัน (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 รูปร่างลักษณะของหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) แต่ละระยะ

4.3 การแพร่กระจายและการระบาด

หนอนกระทู้ผักสามารถพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย เนื่องจากมีพืชอาหารหลายชนิด พบทำลายทั้งในพืชผัก พืชไร่ และไม้ผล โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีการปลูกผักจำนวนมาก เช่น ราชบุรี กาญจนบุรี นครปฐม นนทบุรี และปทุมธานี (นรินทร์, 2544) มีการแพร่กระจายตลอดปีไม่จำกัดฤดูกาล แต่มักพบระบาดมากในช่วงฤดูฝน (วินัย, 2535; ปรีชา, 2536) ส่วนในต่างประเทศพบหนอนแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น เช่น อินเดีย จีน ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย อังกฤษ และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น

4.4 พืชอาหาร

หนอนกระทู้ผักมีพืชอาหารมากมายหลายชนิด มีรายงานว่า มีพืชอาศัยมากกว่า 30 ชนิด ใน 40 สกุล ทั้งพืชผัก พืชไร่ ไม้ดอกและไม้ผล ได้แก่ ผักในตระกูลกะหล่ำ พืชในตระกูลถั่ว และพืชผักชนิดอื่นๆ เช่น คื่นช่าย ผักกาด กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาดหัว ผักกวางตุ้ง หน่อไม้ฝรั่ง มะเขือเทศ ผักบุ้ง ถั่วพู มันเทศ ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวโพด พริก มะเขือ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถเข้าทำลายไม้ดอกและไม้ผลอีกหลายชนิด เช่น กุหลาบ ดาวเรือง มะลิ กล้ายไม้ เบญจมาศ พุทธรักษา เขียวปรีดา องุ่น สตรอเบอร์รี่ เป็นต้น (นรินทร์, 2544)

4.5 ศัตรูธรรมชาติ

แมลงศัตรูธรรมชาติที่พบเสมอๆ ได้แก่ แตนเบียนหนอน *Apanteles* (*Cotesia*) sp. โดยหลังจากหนอนกระทู้ผักถูกเบียนแล้ว 3-5 วัน จะแสดงอาการต่างๆ คือ เคลื่อนไหวช้า ลำตัวสีซีด และกินอาหารได้น้อยลง (นุชรีย์ และคณะ, 2540) นอกจากนี้ยังมีมวนพินาศ *Eocanthacona furcellata* (Wolff) แตนเบียน *Microplitis maculipennis* และเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ไวรัส NPV (Nuclear Polyhedrosis Virus) และแบคทีเรีย *B. thuringiensis*

4.6 การป้องกันกำจัด

การกำจัดหนอนกระทู้ผักสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเก็บกลุ่มไข่และหนอนไปทำลาย ซึ่งวิธีนี้พบว่าได้ผลดีและช่วยลดการระบาดของหนอนกระทู้ผักลงได้ แต่ถ้าหากจำเป็นต้องใช้สารเคมีกำจัดแมลง ควรเลือกใช้สารในกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ ซึ่งใช้ได้ผลดีกว่า (กอบเกียรติ, 2539) นอกจากนี้ยังสามารถกำจัดโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ เช่น ไวรัส NPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมสารจับใบ ฉีดพ่นในเวลาเย็น เมื่อพบหนอนระบาด และใช้แบคทีเรีย *B. thuringiensis* ในขณะที่หนอนมีขนาดเล็ก

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator) รุ่น VS-8480SRN (Vision Scientific, ประเทศเกาหลี)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Refrigerated centrifuge) ขนาด 3 ลิตร รุ่น RC-26 PLUS (Sorvall, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS-245 (Tomy Seiko, ประเทศญี่ปุ่น)
4. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น 1500/2000 (Sheldon Manufacturing, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
5. เมล็ดพันธุ์กะน้ำตาลยัดก้อนใหญ่
6. กระดาษพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว
7. อุปกรณ์การปลูกและดูแลผักคะน้าในเรือนปลูกพืชทดลอง
8. *Bacillus thuringiensis* JC590
9. ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* ทางการค้า
10. กระบอกลี้น้ำ

วิธีการ

1. การเตรียมผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Bacillus thuringiensis* JC590

นำเชื้อ *B. thuringiensis* JC590 จาก stock มา cross streak บนอาหารแข็ง (nutrient agar) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เตรียมกล้าเชื้อโดยเขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง จำนวน 2 หลอดลงในฟลask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมอัตราการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

1.2 การเตรียมเซลล์ *Bacillus thuringiensis* JC590 เข้มข้น

ถ่ายกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในพลาสติกขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 500 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยน้ำอามิ-อามิ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และ NaCl 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปรับสภาพกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเท่ากับ 7 ทำการเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมอัตราการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้ แยกออกจากน้ำหมักด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.3 การปรุงแต่งสูตรผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590

ทำการปรุงแต่งผลิตภัณฑ์ โดยผสมเซลล์ *B. thuringiensis* JC590 เข้มข้นกับสารปรุงแต่งแต่ละชนิดที่ผ่านการฆ่าเชื้ออื่นๆ แล้วในอัตราส่วนต่างๆ ออกเป็น 3 สูตร ดังตารางที่ 2 เก็บผลิตภัณฑ์ในขวดแก้วขนาดความจุ 30 มิลลิลิตร ภายในกล่องทึบที่ป้องกันแสง ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 1 องศาเซลเซียส)

ตารางที่ 2 ส่วนผสมในการปรุงแต่งสูตรผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590

ส่วนผสม	สูตรที่		
	1	2	3
<i>Bacillus thuringiensis</i> เข้มข้น (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	10	10	10
น้ำตาลแล็กโทส (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	4	4	4
กากน้ำตาล ^{1/} (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	10	5	-
น้ำมันปาล์ม (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	40	45	50
ไข่แดง (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	10	11.25	12.50
น้ำกลั่น (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	26	26	26

หมายเหตุ ^{1/} กากน้ำตาลที่ใช้ เจือจางให้มีความเข้มข้น 40-45 เปอร์เซ็นต์ Brix

ที่มา: อุษณีย์ (2549)

2. การศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590

นำผลิตภัณฑ์ปรุงแต่ง *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร มาวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด (total viable count, TVC) และจำนวนสปอร์ทั้งหมด (spore count, SC) แล้วนำมาคำนวณหาอัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตและอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมดในวันที่ 0, 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 ของการเก็บรักษา และเนื่องจากในผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ประกอบด้วยเซลล์และสปอร์อยู่ร่วมกัน ดังนั้นการหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต จึงคำนวณได้จากการนำจำนวนเซลล์ทั้งหมด (total cell count) ที่นับได้ ไปหักลบกับจำนวนสปอร์ทั้งหมด ทำการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยดูดผลิตภัณฑ์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทำการเจือจางแบบ 10 เท่า (10-fold dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-7} - 10^{-9} จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร nutrient agar (NA) เกลี่ยให้ทั่ว (spread plate) จนผิวหน้าอาหารแห้ง ทำระดับความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร (อยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี) และคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดต่อสารละลาย 1 มิลลิลิตร การนับจำนวนสปอร์ทั้งหมดจะทำเช่นเดียวกัน แต่จะนำผลิตภัณฑ์ไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนทำการเจือจาง เพื่อให้เซลล์ของ *B. thuringiensis* แตก

3. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 หลังทำการเก็บรักษา ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) ในห้องปฏิบัติการและเรือนปลูกพืชทดลอง

เตรียมหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) สำหรับทดสอบ โดยซื้อไข่ของหนอนกระทู้ผัก จากกลุ่มงานควบคุมแมลงทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร นำมาเลี้ยงในห้องเลี้ยงแมลง ควบคุมที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ด้วยผักคะน้าปลอดสารพิษ จนกระทั่งหนอนเจริญเป็นวัย 2 จึงคัดเลือกเพื่อนำมาทดสอบ โดยก่อนทดสอบทุกครั้งจะงดอาหารหนอนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) ในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตรกับหนอนกระทู้ผัก ด้วยวิธีจุ่มใบ (leaf dipping method) เริ่มจากนำผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 มาทำการเจือจางแบบ 10 เท่า (10-fold dilution) โดยดูดผลิตภัณฑ์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเจือจางครั้งละ 10 เท่า ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ 5 ระดับ และผสมสารละลายที่ได้กับสารเพิ่มการดูดซึมอัตราส่วน 0.0005 ต่อมิลลิลิตร ตัดใบผักคะน้าเป็นรูปวงกลมโดยใช้อุปกรณ์สำหรับเจาะใบ (puncher) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร จุ่มในสารละลายแล้วนำมาปักไว้ให้หมาด จากนั้นนำใบผักคะน้าใส่ในถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ถ้วยละ 1 ช้อน ใส่หนอนวัย 2 ลงไปด้วยละ 10 ตัว จำนวน 5 ช้อน ต่อความเข้มข้น บันทึกจำนวนหนอนที่ตายหลังจากได้รับสารละลาย *B. thuringiensis* ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (เมื่อหนอนกินใบผักคะน้าที่จุ่มสารละลาย *B. thuringiensis* หหมด จะให้กินใบผักคะน้าที่ปลอดสารพิษตามปกติ) (ภาพที่ 8) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาอัตราการตายที่แท้จริงด้วยวิธี Abbott's formula (Abbott, 1925) และวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ที่ทำให้หนอนตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) ด้วยโปรแกรม Probit analysis (Raymond, 1985) โดยทำการทดสอบหลังการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในวันที่ 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60

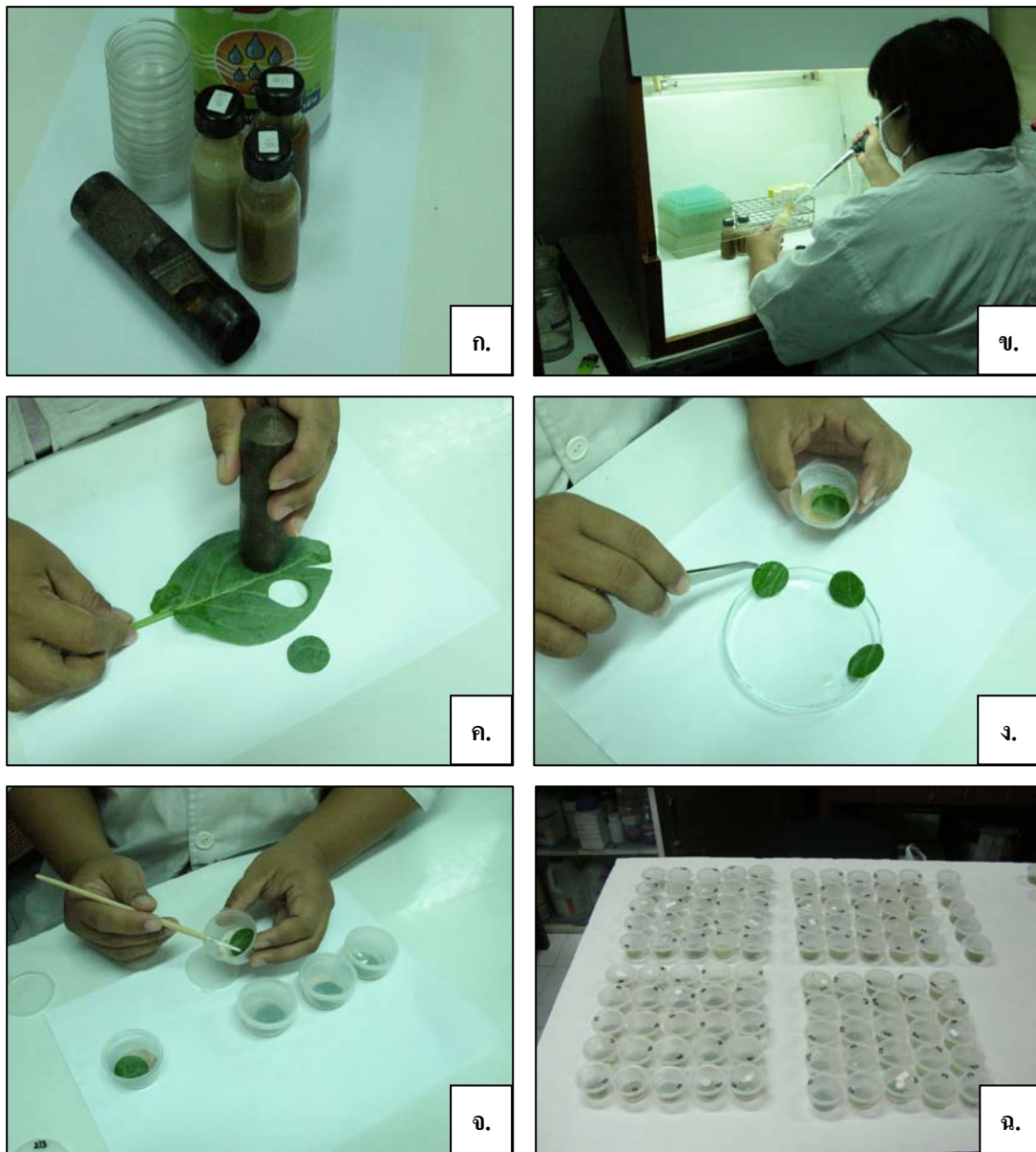
สูตร Abbott's formula

$$P = C + (1-C) P'$$

เมื่อ P คือ อัตราการตายอย่างแท้จริงของแมลง

C คือ อัตราการตายของแมลงในชุดควบคุม (control)

P' คือ อัตราการตายของแมลงที่ได้จากการทดลอง



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) ในห้องปฏิบัติการ

ก. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ

ข.-จ. ขั้นตอนการทดสอบ

ฉ. ถ้วยทดสอบที่ปล่อยหนอนกระทู้ผักลงไปแล้ว

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) ในเรือนปลูกพืชทดลอง

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร ที่มีอายุการเก็บรักษา 1, 30 และ 60 วัน ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ทางการค้า ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดยใช้เรือนปลูกพืชทดลองภาควิชา ศึกษาศาสตร์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และใช้ต้นผักคะน้ายอดต้นใหญ่ สำหรับการทดสอบ เริ่มจากการปลูกคะน้าในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ดูแลรักษาและรดน้ำอย่างสม่ำเสมอจนต้นคะน้ามีอายุ 1 เดือน คัดเลือกต้นคะน้าที่มีขนาดและใบใกล้เคียงกัน จำนวน 8-10 ใบต่อกระถาง จากนั้นปล่อยหนอนกระทู้ผักวัย 2 (หึ่งคอดอาหารแล้ว) กระถางละ 10 ตัว แล้วทำการฉีดพ่นสารละลาย *B. thuringiensis* ในอัตราแนะนำ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomize Design) มี 11 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใช้ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 สูตร 1 ที่มีอายุการเก็บรักษา 1 วัน อัตรา 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมกับสารเพิ่มการดูดซึมอัตราส่วน 0.0005 ต่อมิลลิลิตร ต่อการฉีดพ่น 1 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 2 ใช้ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 สูตร 1 ที่มีอายุการเก็บรักษา 30 วัน อัตรา 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมกับสารเพิ่มการดูดซึมอัตราส่วน 0.0005 ต่อมิลลิลิตร ต่อการฉีดพ่น 1 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 3 ใช้ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 สูตร 1 ที่มีอายุการเก็บรักษา 60 วัน อัตรา 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมกับสารเพิ่มการดูดซึมอัตราส่วน 0.0005 ต่อมิลลิลิตร ต่อการฉีดพ่น 1 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 4 ใช้ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 สูตร 2 ที่มีอายุการเก็บรักษา 1 วัน อัตรา 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมกับสารเพิ่มการดูดซึมอัตราส่วน 0.0005 ต่อมิลลิลิตร ต่อการฉีดพ่น 1 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 5 ใช้ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 สูตร 2 ที่มีอายุการเก็บรักษา 30 วัน อัตรา 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมกับสารเพิ่มการดูดซึมอัตราส่วน 0.0005 ต่อมิลลิลิตร ต่อการฉีดพ่น 1 ไร่

กรรมวิธีที่ 6 ใช้ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 สูตร 2 หลังทำการเก็บรักษา 60 วัน อัตรา 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมกับสารเพิ่มการดูดซึมอัตราส่วน 0.0005 ต่อมิลลิลิตร ต่อการฉีดพ่น 1 ไร่

กรรมวิธีที่ 7 ใช้ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 สูตร 3 ที่มีอายุการเก็บรักษา 1 วัน อัตรา 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมกับสารเพิ่มการดูดซึมอัตราส่วน 0.0005 ต่อมิลลิลิตร ต่อการฉีดพ่น 1 ไร่

กรรมวิธีที่ 8 ใช้ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 สูตร 3 หลังทำการเก็บรักษา 30 วัน อัตรา 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมกับสารเพิ่มการดูดซึมอัตราส่วน 0.0005 ต่อมิลลิลิตร ต่อการฉีดพ่น 1 ไร่

กรรมวิธีที่ 9 ใช้ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 สูตร 3 ที่มีอายุการเก็บรักษา 60 วัน อัตรา 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมกับสารเพิ่มการดูดซึมอัตราส่วน 0.0005 ต่อมิลลิลิตร ต่อการฉีดพ่น 1 ไร่

กรรมวิธีที่ 10 ใช้ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* ทางการค้า อัตรา 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมกับสารเพิ่มการดูดซึมอัตราส่วน 0.0005 ต่อมิลลิลิตร ต่อการฉีดพ่น 1 ไร่

กรรมวิธีที่ 11 ชุดควบคุม (Control) ไม่มีการฉีดพ่นสารใดๆ

ทำการทดลองตามกรรมวิธีข้างต้น โดยฉีดพ่นสารละลายผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ด้วยกระบอกฉีดน้ำให้ทั่วทั้งต้น ในช่วงเวลาเย็น (16.00 -17.00 น.) เพื่อหลีกเลี่ยงรังสีอุลตราไวโอเลต จากแสงแดด บันทึกข้อมูลโดยนับจำนวนหนอนกระทู้ผักที่ตายและรอดชีวิตหลังการฉีดพ่นสาร ทุกๆ 12 ชั่วโมง จนกระทั่งครบ 72 ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้จากการบันทึกมาคำนวณหาประสิทธิภาพ

ของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก โดยใช้สูตร (Henderson and Tilton, 1955) ดังนี้

$$\text{ประสิทธิภาพการควบคุม (\%)} = \frac{C_2T_1 - C_1T_2}{C_2T_1} \times 100$$

เมื่อ C_1, C_2 = จำนวนแมลงที่พบก่อนและหลังการฉีดพ่นในชุดควบคุม

T_1, T_2 = จำนวนแมลงที่พบก่อนและหลังการฉีดพ่นในชุดที่มีการฉีดพ่น *B. thuringiensis*

นำข้อมูลประสิทธิภาพการควบคุมมาวิเคราะห์ผลทางสถิติตามแผนการทดลองและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธีโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ประเมินความเสียหายของผลผลิต โดยคิดจากพื้นที่ใบของผักคะน้าที่ถูกหนอนกระทู้ผักทำลาย ภายหลังการฉีดพ่น 3 วัน โดยแบ่งเป็นระดับคะแนนดังนี้

0 คะแนน = ไม่พบการทำลาย

1 คะแนน = พบพื้นที่ใบถูกทำลาย 1-25 เปอร์เซ็นต์

2 คะแนน = พบพื้นที่ใบถูกทำลาย 26-50 เปอร์เซ็นต์

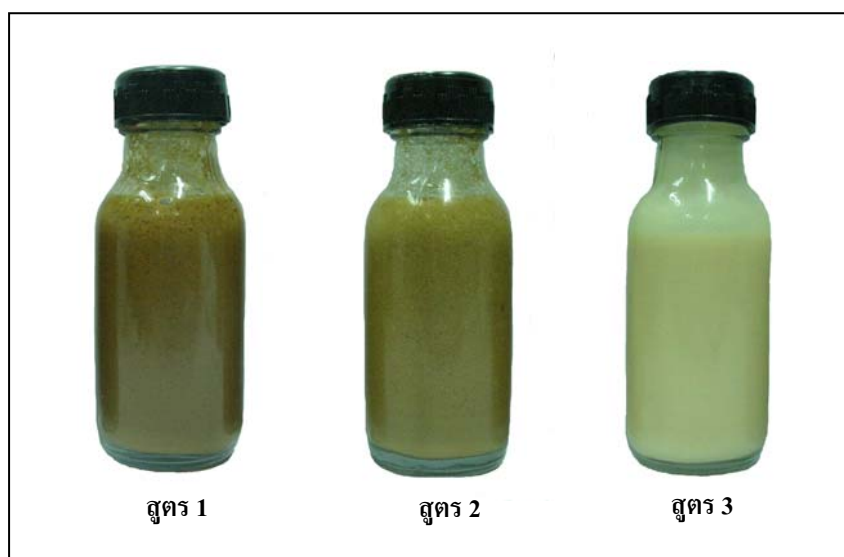
3 คะแนน = พบพื้นที่ใบถูกทำลาย 51-75 เปอร์เซ็นต์

4 คะแนน = พบพื้นที่ใบถูกทำลายมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์

ผลและวิจารณ์

1. การเตรียมผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590

จากการเตรียมผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ได้ผลิตภัณฑ์ปรุงแต่งจำนวน 3 สูตร ที่มีองค์ประกอบการปรุงแต่งประกอบด้วย เซลล์ *B. thuringiensis* JC590 เข้มข้น ซึ่งแยกได้จากน้ำหมักด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง ทำหน้าที่เป็นสารออกฤทธิ์ (active ingredient) กากน้ำตาลและน้ำมันปาล์มเป็นสารตัวพา (carrier) และเป็นตัวช่วยป้องกันเซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ รังสีอัลตราไวโอเลต และการชะล้างจากน้ำฝน น้ำตาลแลคโทส เป็นตัวรักษาความเสถียร (stabilizer) ไข่แดง เป็นอิมัลซิไฟเออร์ และน้ำกลั่น เป็นตัวทำละลาย โดยในแต่ละสูตรมีอัตราส่วนของกากน้ำตาล น้ำมันปาล์ม และไข่แดง ในปริมาณที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 9) ผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในกล่องทึบที่ป้องกันแสง เพื่อนำมาศึกษาอายุการเก็บรักษาต่อไป



ภาพที่ 9 ผลิตภัณฑ์ปรุงแต่ง *Bacillus thuringiensis* JC590

2. การศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590

จากการศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร โดยวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (total viable count, TVC) และสปอร์ทั้งหมด (spore count, SC) หลังการเก็บรักษาในวันที่ 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 โดยกำหนดให้อัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตและอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมดในแต่ละสูตรหลังการปรุงแต่งมีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์สูตร 1 สูตร 2 และสูตร 3 มีค่าเท่ากับ 1.775×10^9 , 1.475×10^9 และ 0.445×10^9 cfu/ml ตามลำดับ และจำนวนสปอร์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์สูตร 1 สูตร 2 และสูตร 3 มีค่าเท่ากับ 0.77×10^9 , 1.07×10^9 และ 0.83×10^9 cfu/ml ตามลำดับ จากตารางที่ 3 พบว่า ในวันที่ 1 ของการเก็บรักษา อัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตของผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และหลังจากผ่านการเก็บรักษาไปแล้ว 1 วัน จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 45 และกลับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 52-60 ของการเก็บรักษา โดยผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 สูตร 1 และสูตร 2 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 15 ของการเก็บรักษา คิดเป็นอัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 17.46 และ 23.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนผลิตภัณฑ์สูตร 3 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 37 ของการเก็บรักษา และมีอัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 32.81 เปอร์เซ็นต์

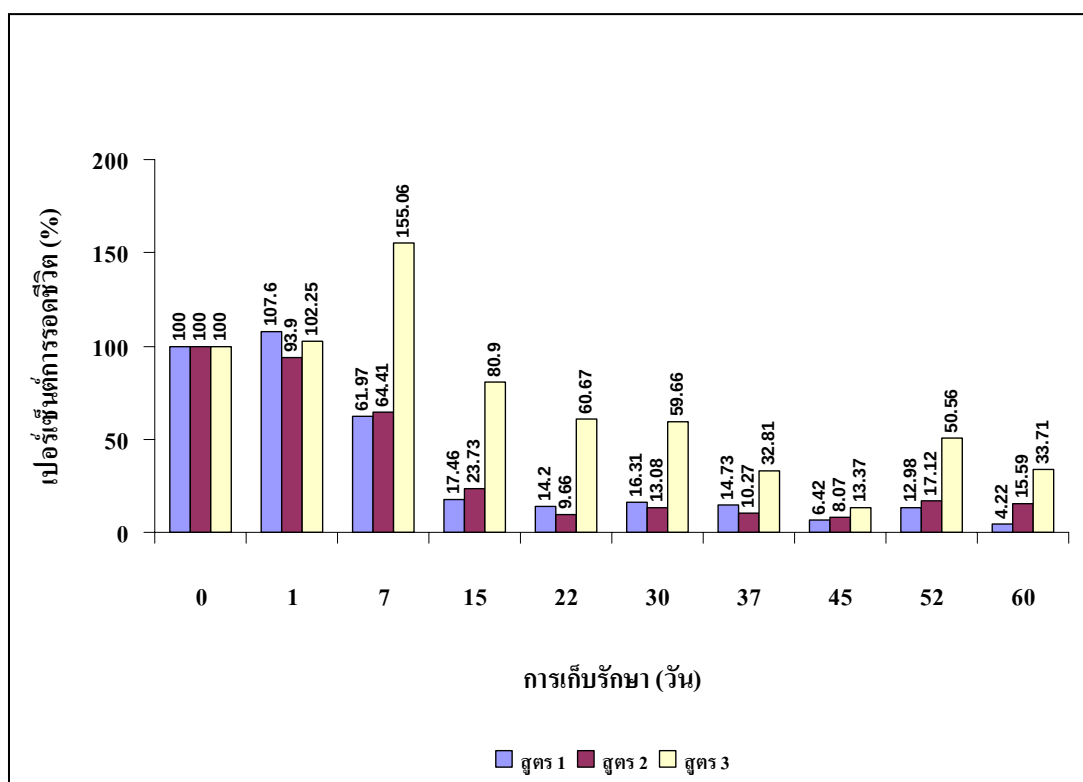
เมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร พบว่า หลังจากเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ 7-60 วัน ผลิตภัณฑ์สูตร 3 จะมีอัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด (ภาพที่ 10) โดยหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน ผลิตภัณฑ์สูตร 1 สูตร 2 และสูตร 3 มีอัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 61.97, 64.41 และ 155.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อทำการเก็บรักษาจนถึงวันที่ 45 พบว่า ผลิตภัณฑ์แต่ละสูตรมีอัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตเพียง 6.42, 8.07 และ 13.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แม้ว่าในช่วงวันที่ 52-60 ของการเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร จะมีอัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้น แต่ก็ยังน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า อัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์สูตร 3 มีค่าสูงที่สุด เนื่องจากในองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์สูตร 3 ไม่มีกากน้ำตาลและมีความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มสูงกว่าผลิตภัณฑ์อีก 2 สูตร เพราะกากน้ำตาลซึ่งใช้ทำน้ำที่เป็นสารตัวพา ไม่บริสุทธิ์ โดยมีองค์ประกอบอื่นๆ ที่ตกค้างจากกระบวนการผลิตปนเปื้อนอยู่และอาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์

B. thuringiensis เล็กน้อย (Burges and Jones, 1998) และคุณสมบัติของน้ำมันปาล์มที่นอกจากจะเป็นสารตัวพาแล้ว ยังทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่เป็นอันตรายได้อีกด้วย (Bernhard *et al.*, 1998) นอกจากนี้ในผลิตภัณฑ์ที่ทำการปรุงแต่งไข่ไขแดงเป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์ ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่สมบูรณ์ชนิดหนึ่งที่เซลล์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ สอดคล้องกับ รายงานการศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำมันปาล์มและน้ำตาลแลคโทสต่ออายุการเก็บรักษา *B. thuringiensis* JC590 ในรูปน้ำเข้มข้นของอูษณีย์ (2549) ที่พบว่า เมื่อความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มสูงขึ้น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ *B. thuringiensis* ที่มีชีวิตสูงขึ้น และรายงานของ Hou *et al.* (2003) ที่พบว่า เมื่อใช้น้ำมันงาเทียมห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* และทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 วัน ทำให้มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 0.023 เปอร์เซ็นต์ เป็น 5.45 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้จันทิมา (2545) พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารป้องกันเซลล์ 3 ชนิด คือ น้ำมันพืช กลีเซอรอล และน้ำมันมะพร้าว ในสูตรสำเร็จ *Bacillus* spp. MK 007 จาก 5 เปอร์เซ็นต์ เป็น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่งผลให้ปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดหลังการทำแห้งเพิ่มสูงขึ้น

ตารางที่ 3 อัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด หลังทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน

ผลิตภัณฑ์	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด x 10 ⁹ (cfu/ml)									
	(เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในการเก็บรักษา)									
	วันที่ทำการเก็บรักษา									
สูตร	0	1	7	15	22	30	37	45	52	60
1	1.775	1.910	1.100	0.310	0.252	0.2895	0.2615	0.114	0.2305	0.075
	(100.00)	(107.60)	(61.97)	(17.46)	(14.20)	(16.31)	(14.73)	(6.42)	(12.98)	(4.22)
2	1.475	1.385	0.950	0.350	0.1425	0.193	0.1515	0.119	0.2525	0.230
	(100.00)	(93.90)	(64.41)	(23.73)	(9.66)	(13.08)	(10.27)	(8.07)	(17.12)	(15.59)
3	0.445	0.455	0.690	0.360	0.270	0.2655	0.146	0.0595	0.225	0.150
	(100.00)	(102.25)	(155.06)	(80.90)	(60.67)	(59.66)	(32.81)	(13.37)	(50.56)	(33.71)



ภาพที่ 10 อัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน

สำหรับการวิเคราะห์หาจำนวนสปอร์ทั้งหมด จากตารางที่ 4 พบว่า จำนวนสปอร์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำการเก็บรักษา 15 วัน และจากภาพที่ 11 เมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร พบว่า หลังจากเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ 60 วัน ผลิตภัณฑ์สูตร 3 มีอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมดสูงสุด เช่นเดียวกับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (ตารางที่ 3) โดยหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 วัน ผลิตภัณฑ์สูตร 1 สูตร 2 และสูตร 3 มีอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมดเท่ากับ 81.17, 92.52 และ 93.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จนถึงวันที่ 52 ของการเก็บรักษา พบว่า ผลิตภัณฑ์แต่ละสูตรมีอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมดต่ำสุดเพียง 3.12, 1.36 และ 5.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากผลดังกล่าวจะเห็นได้ว่า อัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตและอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันคือ อัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตและสปอร์ทั้งหมดจะลดลงอย่างต่อเนื่องหลังทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ โดยในช่วง 15 วันแรกของการเก็บรักษา จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและจำนวนสปอร์ทั้งหมดจะต่ำกว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและจำนวนสปอร์ทั้งหมดหลังการปรุงแต่งผลิตภัณฑ์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเซลล์และสปอร์ของ *B. thuringiensis* ในผลิตภัณฑ์อยู่ในสภาวะที่เปลี่ยนแปลงไปจากสภาวะในถังหมัก จึงมีโอกาทำให้เซลล์และสปอร์บางส่วนตาย และในผลิตภัณฑ์สูตร 3 มีอัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตและสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าผลิตภัณฑ์อีก 2 สูตร ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวขัดแย้งกับรายงานการศึกษาผลของความเข้มข้นกากน้ำตาล น้ำมันปาล์มและน้ำตาลแล็กโทส ต่ออายุการเก็บรักษา *B. thuringiensis* JC590 ในรูปน้ำเข้มข้นของอุษณีย์ (2549) ที่พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นของกากน้ำตาลสูงและน้ำมันปาล์มต่ำ ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ที่มีชีวิตและสปอร์ทั้งหมด เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีแนวโน้มสูงขึ้น เนื่องจากกากน้ำตาลจัดว่าเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่เซลล์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย อีกทั้งความเข้มข้นของกากน้ำตาลมีปริมาณสูง เซลล์จึงนำไปใช้ได้เต็มที่ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษของกากน้ำตาลต่อเซลล์ *B. thuringiensis* ที่เกิดจากสารปนเปื้อนอื่นๆ ซึ่งตกค้างในระหว่างกระบวนการผลิตดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

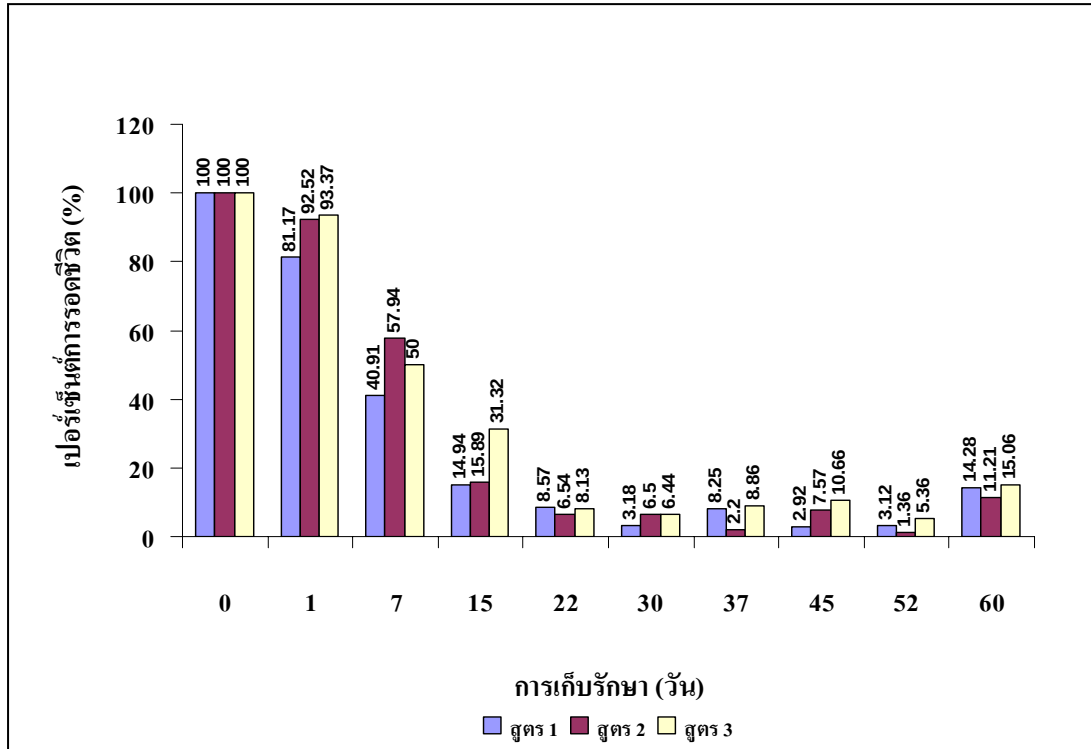
นอกจากนี้อุณหภูมิการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ อาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สามารถส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตและอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมด โดยส่วนใหญ่การเก็บ

รักษาผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์จะนิยมใช้อุณหภูมิภายในตู้เย็น (4-9 องศาเซลเซียส) จากงานวิจัยของ อุษณีย์ (2549) พบว่าเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ที่อุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส ทำให้มี อัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตและสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 3.1-15.96 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Roberto *et al.* (2002) ที่ทำการเก็บ รักษาสูตรผลิตภัณฑ์ conidia ของเชื้อรากำจัดศัตรูพืชชนิดหนึ่ง พบว่าหลังทำการเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 สัปดาห์ มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเหลือสูงกว่าการเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และงานวิจัยของ Vieira and Nahas (1998) ที่พบว่าจำนวนเชื้อ *Bacillus* sp. จะเพิ่มขึ้น 1.9-4.9 เท่าหลังจากเก็บรักษาไว้นาน 12 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส รวมถึง Moore *et al.* (1996) ที่พบว่าในระหว่างการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 3 เดือน ส่งผลให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเสียไป

เกณฑ์การพิจารณาความเหมาะสมของอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ คือระยะเวลาที่สามารถ เก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นานที่สุด โดยผลิตภัณฑ์มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากกระบวนการผลิตและ การเก็บรักษาน้อยที่สุด ดังนั้นในผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก *B. thuringiensis* จะให้ความสำคัญกับอัตราการ รอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมด ว่าไม่ควรแตกต่างจากเปอร์เซ็นต์การเก็บรักษาเริ่มต้น เนื่องจากโปรตีน สารพิษของ *B. thuringiensis* ที่มีฤทธิ์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชจะสร้างขึ้นพร้อมๆ กับการสร้าง สปอร์ ส่วนใหญ่ *B. thuringiensis* จะสร้าง 1 สปอร์ และ 1 ผลึกโปรตีน (Hickle and Fitch, 1990) จากตารางที่ 5 เมื่อพิจารณาจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตทั้งหมดหลังทำการเก็บรักษาที่ระยะเวลาแตกต่าง กันของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร พบว่า หลังจากวันที่ 15 ของการเก็บรักษา จำนวนสปอร์ทั้งหมดที่รอดชีวิตของผลิตภัณฑ์สูตร 1 และสูตร 2 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนในผลิตภัณฑ์สูตร 3 พบว่า หลังจากวันที่ 22 ของการเก็บรักษา จำนวนสปอร์ทั้งหมดที่รอดชีวิต ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน แม้ว่าหลังจากวันที่ 15-22 ของการเก็บรักษา อัตราการรอด ชีวิตของสปอร์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ทุกๆ สูตรจะลดลงอย่างมากจากการเก็บรักษาเริ่มต้น แต่การ พิจารณาถึงความเหมาะสมของอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 นอกจากจะ คำนึงถึงอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ที่จำนวนสปอร์ทั้งหมดใกล้เคียงกับอัตราการรอดชีวิตหลังการ ปปรุงแต่งผลิตภัณฑ์แล้ว ยังต้องพิจารณาถึงประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชของผลิตภัณฑ์ ควบคู่กันไปด้วย

ตารางที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมด หลังทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน

ผลิตภัณฑ์	จำนวนสปอร์ทั้งหมด x 10 ⁹ (cfu/ml)									
	(เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในการเก็บรักษา)									
	วันที่ทำการเก็บรักษา									
สูตร	0	1	7	15	22	30	37	45	52	60
1	0.770	0.625	0.315	0.115	0.066	0.0245	0.0635	0.025	0.024	0.110
	(100.00)	(81.17)	(40.91)	(14.94)	(8.57)	(3.18)	(8.25)	(2.92)	(3.12)	(14.28)
2	1.070	0.990	0.620	0.170	0.070	0.0695	0.0235	0.081	0.0145	0.120
	(100.00)	(92.52)	(57.94)	(15.89)	(6.54)	(6.50)	(2.20)	(7.57)	(1.36)	(11.21)
3	0.830	0.775	0.415	0.260	0.0675	0.0535	0.0735	0.0885	0.0445	0.125
	(100.00)	(93.37)	(50.00)	(31.32)	(8.13)	(6.44)	(8.86)	(10.66)	(5.36)	(15.06)



ภาพที่ 11 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมด ในผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน

ตารางที่ 5 จำนวนสปอร์ทั้งหมดที่รอดชีวิต หลังทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน

วันที่ทำการเก็บรักษา	จำนวนสปอร์ทั้งหมดที่รอดชีวิต x 10 ⁷ (cfu/ml) ^{1/}		
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3
1	62.50 c	99.00 d	77.50 f
7	31.50 b	62.00 c	41.50 e
15	11.50 a	17.00 b	26.00 d
22	6.60 a	7.00 ab	6.75 ab
30	2.45 a	6.95 ab	5.35 ab
37	6.35 a	2.35 ab	7.35 ab
45	2.25 a	8.10 ab	8.85 bc
52	2.40 a	1.45 a	4.45 a
60	11.00 a	12.00 b	12.50 c

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวนองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (ทดสอบโดยใช้ DMRT)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 หลังทำการเก็บรักษา ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) ในห้องปฏิบัติการและเรือนปลูกพืชทดลอง

3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ในการควบคุม หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) ในห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร ในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีการจุ่มใบ (leaf dipping method) โดยให้หนอนกินใบผักคะน้าที่จุ่มสารละลาย *B. thuringiensis* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งได้จากการนับความเข้มข้นของเซลล์ที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์ จากตารางที่ 6 พบว่า หลังทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 วัน มีผลทำให้ผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร มีค่าความเข้มข้นและมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตและสปอร์ทั้งหมดของผลิตภัณฑ์ (ภาพที่ 10 และ 11) โดยเมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นและอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักระหว่างการใส่ผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร พบว่า ผลิตภัณฑ์สูตร 1 มีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักสูงสุด แต่ในวันที่ 22 และ 30 ของการเก็บรักษา พบว่า ผลิตภัณฑ์สูตร 3 มีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักสูงสุด โดยในวันที่ 1 ของการเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์สูตร 1 สูตร 2 และสูตร 3 มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 2.54×10^9 , 2.38×10^9 และ 1.23×10^9 cfu/ml ตามลำดับ และมีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักเท่ากับ 94.00, 98.00 และ 86.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่วันที่ 22 ของการเก็บรักษา พบว่า ผลิตภัณฑ์สูตร 1 สูตร 2 และสูตร 3 มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 3.18×10^8 , 2.12×10^8 และ 3.38×10^8 cfu/ml ตามลำดับ และมีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักเท่ากับ 63.92, 76.29 และ 80.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และวันที่ 30 ของการเก็บรักษา พบว่า ผลิตภัณฑ์สูตร 1 สูตร 2 และสูตร 3 มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 3.14×10^8 , 2.62×10^8 และ 3.19×10^8 cfu/ml ตามลำดับ และมีอัตราการตายของหนอนกระทู้ผักเท่ากับ 58.58, 60.61 และ 74.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากตารางที่ 7 เมื่อคำนวณหาความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร ที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) พบว่า หลังการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในช่วง 1-45 วัน ผลิตภัณฑ์แต่ละสูตรมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักใกล้เคียงกัน คือ มีค่า LC_{50} อยู่ระหว่าง 1.92×10^5 - 1.68×10^7 cfu/ml และหลังจากเก็บรักษาไว้นาน 52-60 วัน

ประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักจะมีค่าลดลง แต่เมื่อพิจารณาช่วงของค่าความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุดของผลิตภัณฑ์ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก พบว่า ในช่วงวันที่ 30-60 ของการเก็บรักษา มีค่าไม่แตกต่างกัน เห็นได้ว่าระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่นานขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการควบคุมหนอนมีค่าลดลง สอดคล้องกับ Farghal and Darwish (1988) ที่ทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* (Bactimos) ที่เก็บไว้เป็นเวลา 1, 3, 7, 10, 15 และ 30 วัน ภายใต้อุณหภูมิ -20, -10, 5, 25, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส กับลูกน้ำยุงรำคาญ (*Culex pipiens molestus*) พบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นพิษจะลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น

จากผลการทดลองข้างต้น เมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสมของอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร โดยผลิตภัณฑ์สามารถเก็บรักษาได้นานที่สุด มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากกระบวนการผลิตและเก็บรักษาผลิตภัณฑ์น้อยที่สุด และยังมีประสิทธิภาพดีในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) ในห้องปฏิบัติการ พบว่า อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สูตรที่มีความเหมาะสมที่สุด คือ 60 วัน เนื่องจากมีอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมดและมีค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) ไม่แตกต่างกัน ในช่วงวันที่ 22-60 ของการเก็บรักษา สอดคล้องกับรายงานของจริยา และคณะ (2550) ที่ศึกษาการพัฒนาแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ไทย พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ปรุงแต่งโดยกากน้ำตาล น้ำมันปาล์ม และน้ำตาลแล็กโทส สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้นาน 60 วัน และมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) และหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) ในห้องปฏิบัติการได้ดีที่สุด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.440×10^7 , 7.960×10^7 และ 13.10×10^7 cfu/ml ตามลำดับ และรายงานของ Ejiofor and Okafor (1991) ซึ่งศึกษาการปรุงแต่งสารแขวนลอยจากสปอร์และผลึกโปรตีนของ *B. thuringiensis* serotype H-14 โดยใช้กากน้ำตาล น้ำมันปาล์ม แป้งมันสำปะหลัง และผงถ่าน พบว่า มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 3.2×10^9 cfu/ml และมีค่า LC_{50} หลังจากทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 32 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1 และ 2 ปี เท่ากับ 0.056, 0.058 และ 0.058 mg/ml ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 3 สูตร และอัตราการตายที่แท้จริงของหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) หลังทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน

วันที่ทำการ เก็บรักษา	สูตร	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ <i>B. thuringiensis</i> (cfu/ml)	อัตราการตาย ของหนอนกระทู้ผัก ^{1/} (%)
1	1	2.54×10^9	94.00
	2	2.38×10^9	98.00
	3	1.23×10^9	86.00
7	1	1.42×10^9	84.85
	2	1.57×10^9	72.73
	3	1.10×10^9	74.75
15	1	4.25×10^8	79.59
	2	5.20×10^8	65.31
	3	6.20×10^8	69.94
22	1	3.18×10^8	63.92
	2	2.12×10^8	76.29
	3	3.38×10^8	80.04
30	1	3.14×10^8	58.58
	2	2.62×10^8	60.61
	3	3.19×10^8	74.75
37	1	3.25×10^8	69.39
	2	1.75×10^8	69.39
	3	2.20×10^8	63.26
45	1	1.39×10^8	78.00
	2	2.00×10^8	70.00
	3	1.48×10^8	52.00
52	1	2.54×10^8	56.00
	2	2.67×10^8	58.00
	3	2.70×10^8	38.00

ตารางที่ 6 (ต่อ)

วันที่ทำการ เก็บรักษา	สูตร	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ <i>B. thuringiensis</i> (cfu/ml)	อัตราการตาย ของหนอนกระทู้ผัก ^{1/} (%)
60	1	1.85×10^8	34.34
	2	3.50×10^8	16.16
	3	2.75×10^8	20.20

หมายเหตุ ^{1/}อัตราการตายที่แท้จริง คำนวณโดยใช้สูตร Abbott's formula

ตารางที่ 7 ค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 3 สูตร ที่ทำให้หนอน
กระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) หลังทำการเก็บรักษา
ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน

วันที่ทำการ เก็บรักษา	สูตร	LC_{50} (cfu/ml)	95% Fiducial limit		Slope (mean±SE)
			Lower	Upper	
1	1	4.81×10^5	6.01×10^2	2.51×10^8	0.45±0.23
	2	3.25×10^5	9.35×10^4	7.51×10^5	0.57±0.09
	3	6.24×10^6	1.63×10^6	3.67×10^7	0.32±0.08
7	1	1.58×10^6	7.00×10^5	3.25×10^6	0.63±0.09
	2	2.77×10^6	1.59×10^5	3.50×10^7	0.22±0.08
	3	4.43×10^6	1.33×10^6	1.66×10^7	0.38±0.08
15	1	1.92×10^5	4.97×10^4	5.88×10^5	0.40±0.09
	2	2.94×10^6	3.28×10^5	3.43×10^{12}	0.19±0.08
	3	1.22×10^6	3.95×10^5	6.50×10^6	0.39±0.09
22	1	2.19×10^6	7.69×10^5	1.15×10^7	0.45±0.10
	2	1.86×10^6	7.08×10^5	7.63×10^6	0.49±0.10
	3	3.87×10^6	1.27×10^6	2.88×10^7	0.45±0.10
30	1	8.03×10^6	2.17×10^6	1.30×10^8	0.40±0.09
	2	1.16×10^6	2.27×10^5	2.97×10^7	0.26±0.08
	3	1.30×10^7	2.22×10^6	3.03×10^9	0.29±0.09
37	1	1.68×10^7	2.06×10^6	1.80×10^{11}	0.25±0.09
	2	3.41×10^5	1.17×10^2	9.87×10^5	0.45±0.09
	3	1.01×10^6	1.16×10^5	2.31×10^8	0.21±0.08
45	1	1.16×10^6	2.68×10^5	1.62×10^7	0.28±0.08
	2	8.93×10^6	1.28×10^6	1.82×10^{10}	0.24±0.08
	3	1.78×10^6	- ^{1/}	- ^{1/}	0.10±0.08
52	1	5.73×10^{10}	- ^{1/}	- ^{1/}	0.14±0.08
	2	4.52×10^{11}	- ^{1/}	- ^{1/}	0.13±0.09
	3	2.76×10^8	0.00	2.90×10^{25}	0.31±0.18

ตารางที่ 7 (ต่อ)

วันที่ทำการ เก็บรักษา	สูตร	LC ₅₀ (cfu/ml)	95% Fiducial limit		Slope (mean±SE)
			Lower	Upper	
60	1	1.82×10 ⁹	5.76×10 ⁷	6.45×10 ¹⁹	0.36±0.14
	2	1.36×10 ¹¹	- ^{1/}	- ^{1/}	0.41±0.56
	3	3.26×10 ⁹	6.25×10 ⁷	6.34×10 ²³	0.30±0.12

หมายเหตุ ^{1/} Fiducial limit could not be generated

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ในการควบคุม หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) ในเรือนปลูกพืชทดลอง

จากการศึกษาอายุการเก็บรักษาและทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร ในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในห้องปฏิบัติการ พบว่า ผลิตภัณฑ์ทุกสูตรสามารถเก็บรักษาได้นานที่สุด 60 วัน โดยยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก ดังนั้นจึงทำการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร ที่มีอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 1, 30 และ 60 วัน ในเรือนปลูกพืชทดลอง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เมื่อมีการนำไปใช้ในสภาพใกล้เคียงแปลงปลูกจริง จากตารางที่ 8 พบว่า หลังจากฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ทุกกรรมวิธี เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ประสิทธิภาพการควบคุมหนอนกระทู้ผักของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 แต่ละกรรมวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผลิตภัณฑ์สูตร 1 และสูตร 2 ที่มีอายุการเก็บรักษา 1 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับสูตร 3 และผลิตภัณฑ์ทางการค้า สำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีอายุการเก็บรักษา 30 วัน ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ส่วนผลิตภัณฑ์ที่มีอายุการเก็บรักษา 60 วัน พบว่า หลังจากฉีดพ่นไปแล้ว 12 ชั่วโมง ทุกสูตรประสิทธิภาพในการควบคุมมีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่หลังจากผ่าน 24 ชั่วโมง ไปแล้ว ผลิตภัณฑ์ทุกสูตรมีประสิทธิภาพในการควบคุมไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ในขณะที่หลังจากฉีดพ่น *B. thuringiensis* เป็นเวลา 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่า ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร ที่มีอายุการเก็บรักษา 1, 30 และ 60 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวขัดแย้งกับอัตราการรอดของเซลล์ที่มีชีวิตและอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมด อาจเนื่องมาจากสาเหตุที่ทำให้แมลงตายที่แท้จริงคือ แมลงได้รับผลึกโปรตีนของ *B. thuringiensis* ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์เข้าไป ซึ่งในการทดลองนี้ไม่ได้มีการนับจำนวนผลึกโปรตีนโดยตรงค่าที่ได้จึงไม่แน่นอน โดยหลังจาก 48 ชั่วโมง เป็นต้นไปข้อมูลที่บันทึกได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากการออกฤทธิ์ของ *B. thuringiensis* ต่อแมลงจะใช้เวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง หลังจากแมลงได้รับ *B. thuringiensis* เข้าไปในร่างกาย และจะขึ้นอยู่กับปริมาณของ *B. thuringiensis* ที่แมลงได้รับเข้าไปด้วย (ทิพย์วดี, 2535) และจากการแบ่งระดับคะแนนความเสียหายของผลผลิต โดยใช้เกณฑ์การยอมรับทางการตลาด พบว่าผลผลิตที่ได้จากการทดลองทุกๆ กรรมวิธี มีความเสียหายอยู่ในระดับ 1 คะแนน คือพบการทำลายของพื้นที่ใบ 1-25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ดีและสามารถยอมรับได้ (ภาพที่ 12)

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร ในการควบคุม หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) หลังการฉีดพ่นในเรือนปลูกพืชทดลอง เป็นเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

กรรมวิธี ^{1/}	ประสิทธิภาพการควบคุมหนอนกระทู้ผัก (%) ^{2/, 3/} ของผลิตภัณฑ์ <i>B. thuringiensis</i> หลังการฉีดพ่น				ระดับการถูกทำลาย ^{4/}
	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	
1	40.44 cd	45.14 b	56.07	53.91 ab	1
2	5.02 ab	15.67 ab	69.46	65.95 ab	1
3	30.12 cd	55.31 b	91.92	89.91 ab	1
4	27.22 cd	42.83 b	69.05	68.83 ab	1
5	1.66 a	21.80 ab	48.62	30.48 a	1
6	17.32 bcd	39.50 b	79.28	79.28 ab	1
7	10.28 bc	6.94 a	60.43	56.33 ab	1
8	15.60 bcd	34.08 b	50.77	56.82 ab	1
9	47.70 d	65.62 b	92.30	92.30 b	1
10	54.25 d	69.79 b	69.79	69.79 ab	1
11 ^{5/}	-	-	-	-	2
F-test	5.30**	2.40*	1.06 ns	>1	-
C.V. (%)	13.20	11.99	2.3	5.35	-

ns = not significant

* = significant at 5% level

** = significant at 1% level

หมายเหตุ ^{1/} กรรมวิธีที่ 1, 2 และ 3 ใช้ผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 สูตร 1 ที่มีอายุการเก็บรักษา 1, 30 และ 60 วัน
กรรมวิธีที่ 4, 5 และ 6 ใช้ผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 สูตร 2 ที่มีอายุการเก็บรักษา 1, 30 และ 60 วัน
กรรมวิธีที่ 7, 8 และ 9 ใช้ผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 สูตร 3 ที่มีอายุการเก็บรักษา 1, 30 และ 60 วัน
กรรมวิธีที่ 10 ใช้ผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ทางการค้า (ฟลอว์แบค เอฟ.ซี.)
กรรมวิธีที่ 11 ไม่มีการฉีดพ่นสารใดๆ

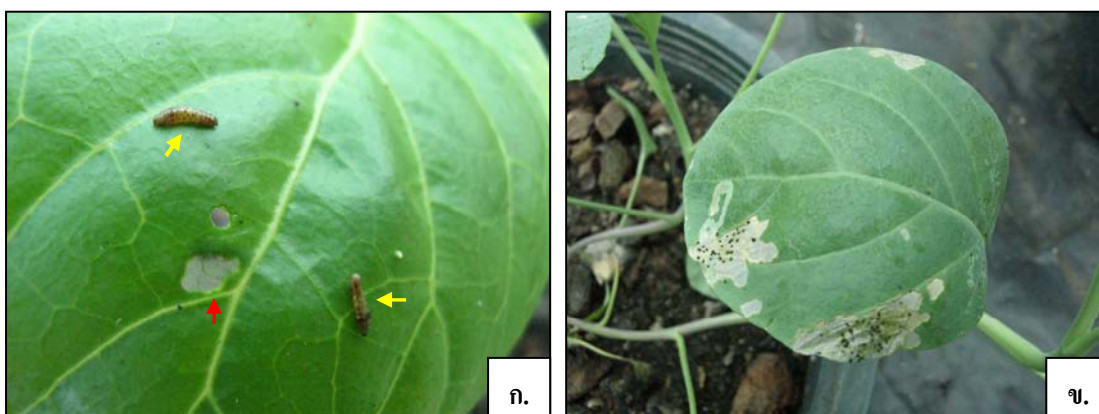
ตารางที่ 8 (ต่อ)

หมายเหตุ ^{2/} ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวดังไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (ทดสอบโดยใช้ DMRT)

^{4/} ระดับการถูกทำลายของใบผักคะน้า

^{5/} ไม่ได้นำมาคิดค่าทางสถิติ



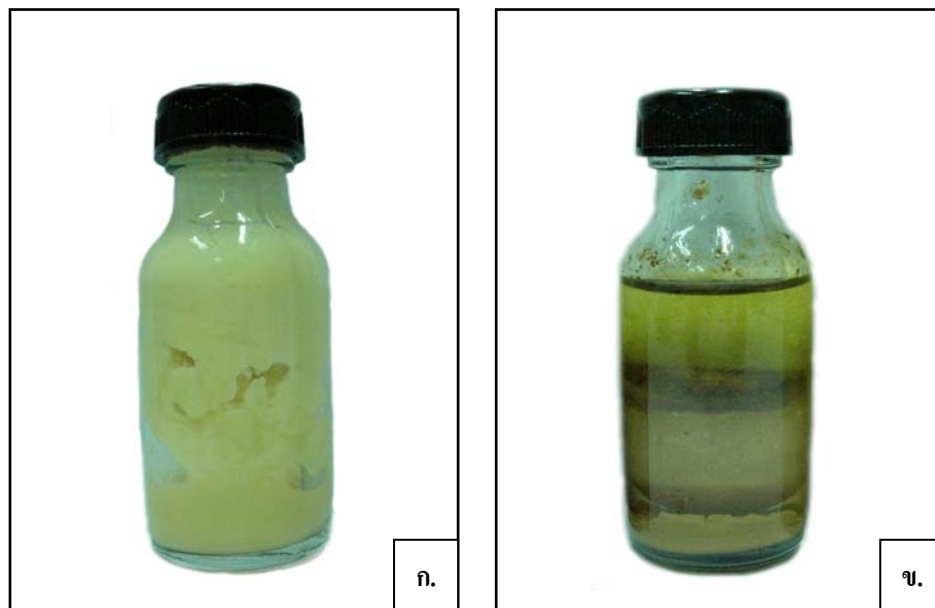
ภาพที่ 12 ลักษณะของใบผักคะน้าที่ถูกหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) ทำลายหลังการฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* ในเรือนปลูกพืชทดลอง

ก. ร่องรอยการกัดกินใบผักคะน้าของหนอนกระทู้ผัก (ลูกศรสีแดง) และหนอนกระทู้ผักที่ตายหลังได้รับ *Bacillus thuringiensis* (ลูกศรสีเหลือง)

ข. ร่องรอยการกัดกินใบผักคะน้าของหนอนกระทู้ผักและมูลที่หนอนขับถ่ายออกมา

จากการทดลองครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตรมีอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องที่มีความเหมาะสมที่สุดคือ 60 วัน โดยยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักได้ทั้งในห้องปฏิบัติการและในเรือนปลูกพืชทดลอง แต่ยังพบปัญหาและอุปสรรคในระหว่างการเก็บรักษา คือ ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นครีมข้น เกิดการแยกชั้นขององค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ (ภาพที่ 13) ผลิตภัณฑ์เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราและจุลินทรีย์ชนิดอื่น และมีกลิ่นเหม็น เนื่องจากในผลิตภัณฑ์ซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำกลั่นและน้ำมันปาล์ม ซึ่งไม่สามารถผสมให้เข้ากันได้ และในการทดลองนี้ใช้ไข่แดงเป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์ อาจไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดสถานะอิมัลชัน (การรวมกันของน้ำกับน้ำมัน) ได้อย่างสมบูรณ์ จึงทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำมันปาล์มกับองค์ประกอบอื่น ซึ่งโดยปกติแล้วสารผสมที่มีองค์ประกอบของน้ำและน้ำมัน มักเกิดปัญหาการเป็นครีมและการแยกชั้นเสมอ (Couch and Ignoffo, 1981; Narayanan *et al.*, 1997) และในผลิตภัณฑ์ซึ่งมีองค์ประกอบของกากน้ำตาล น้ำตาลแล็กโทส และไข่แดง ซึ่งทำให้เชื้อราและจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ปนเปื้อนระหว่างทำการทดลอง สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตได้ และจากกระบวนการที่เซลล์ของแบคทีเรียย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะขาดออกซิเจน ส่งผลทำให้เกิดแก๊สที่มีกลิ่นเหม็น

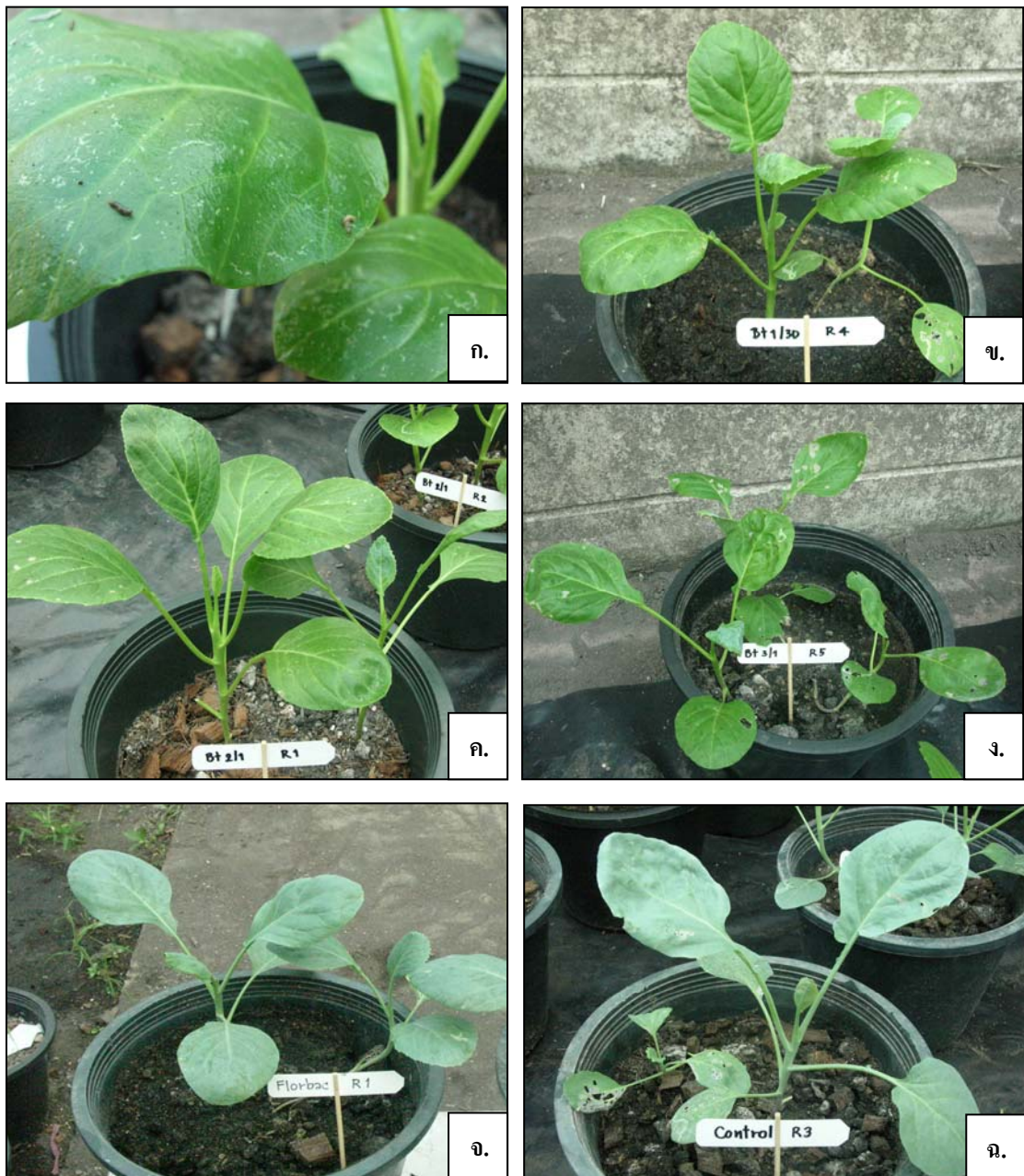
นอกจากนี้หลังการฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร ลงบนต้นกะน้า ซึ่งเป็นผักที่มีนวลสีขาวปกคลุมใบ จะทำให้ใบมีลักษณะเป็นมันวาว (ภาพที่ 14) ซึ่งแตกต่างจากการใช้ผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ทางการค้า และในชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากในผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร มีน้ำมันปาล์มเป็นองค์ประกอบที่มีประสิทธิภาพในการจับใบได้ดี (Sundaram *et al.*, 1993) จากผลการทดลองข้างต้น แม้ว่าผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 จะมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักได้ดี แต่จากปัญหาดังกล่าวอาจทำให้การยอมรับของผู้ใช้ที่มีต่อผลิตภัณฑ์ลดน้อยลง เนื่องจากผักกะน้าเป็นผักที่มีการบริโภคส่วนของใบและลำต้น ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาสูตรการปรุงแต่งผลิตภัณฑ์ เพื่อแก้ปัญหาต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น



ภาพที่ 13 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา

ก. ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นครีมข้น

ข. ผลิตภัณฑ์เกิดการแยกชั้น



ภาพที่ 14 ลักษณะของใบผักกะน้าหลังการฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590
 ก.-ง. ต้นผักกะน้าที่ใช้ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร
 จ. ต้นผักกะน้าที่ฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* ทางการค้า
 ฉ. ต้นผักกะน้าที่ไม่มีการฉีดพ่นสารใดๆ (ชุดควบคุม)

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 3 สูตร ได้แก่ สูตร 1 ประกอบด้วยเซลล์ *B. thuringiensis* JC590 เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก กากน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำมันปาล์ม 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ไข่แดง 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำตาลแล็กโทส 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และน้ำกลั่น 26 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สูตร 2 ประกอบด้วยเซลล์ *B. thuringiensis* JC590 เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก กากน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำมันปาล์ม 45 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ไข่แดง 11.25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำตาลแล็กโทส 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และน้ำกลั่น 26 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และสูตร 3 ประกอบด้วย เซลล์ *B. thuringiensis* JC590 เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก น้ำมันปาล์ม 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ไข่แดง 12.50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำตาลแล็กโทส 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และน้ำกลั่น 26 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่า อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่มีความเหมาะสมที่สุด โดยผลิตภัณฑ์สามารถเก็บรักษาได้นานที่สุด มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากกระบวนการผลิตและเก็บรักษาน้อยที่สุด และยังคงมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) คือ 60 วัน โดยผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 สูตร 1 สูตร 2 และสูตร 3 มีจำนวนการรอดชีวิตของสปอร์ทั้งหมด เท่ากับ 1.1×10^8 , 1.2×10^8 และ 1.25×10^8 cfu/ml คิดเป็น 14.28, 11.21 และ 15.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการเก็บรักษาเริ่มต้น และมีค่าความเข้มข้นที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) เท่ากับ 1.82×10^9 , 1.36×10^{11} และ 3.26×10^9 cfu/ml ตามลำดับ

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร ในการควบคุมหนอนกระทู้ผักที่ทำลายต้นผักคะน้าในเรือนปลูกพืชทดลอง เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ทางการค้า พบว่า หลังจากการฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 ที่มีอายุการเก็บรักษา 60 วัน และผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ทางการค้า ไปแล้ว 48 ชั่วโมง ประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักของผลิตภัณฑ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* JC590 สูตร 1 สูตร 2 สูตร 3 และผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ทางการค้า มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักได้เท่ากับ 89.91, 79.28, 92.30 และ 69.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ปัญหาและอุปสรรคที่พบทั้งในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์และการนำผลิตภัณฑ์ไปใช้ มาจากสาเหตุขององค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ไม่เหมาะสม จึงทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการแยกชั้น มีลักษณะเป็นครีม มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น และเกิดกลิ่นเหม็นในระหว่างการเก็บรักษา และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ไปใช้ทดสอบในเรือนปลูกพืชทดลอง ก็พบปัญหาคือผลิตภัณฑ์ทำให้ใบผักคะน้ามีลักษณะเป็นมันวาว จากปัญหาดังกล่าวอาจส่งผลต่อการยอมรับของผู้ใช้ที่มีต่อผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงควรพัฒนาการปรุงแต่งผลิตภัณฑ์ต่อไปเพื่อแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ. 2542. **แมลงศัตรูผัก**. เอกสารวิชาการกองกีฏ และสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

กอบเกียรติ บันสิทธิ์. 2539. **แมลงและการควบคุมแมลงศัตรูผัก**, น. 31-83. ใน **หลักและวิธีการผลิตผักอนามัย**. โครงการนำร่องการผลิตผักผลไม้สดอนามัย กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

จริยา จันทรไพแสง, ปทุมพร นิมนเอก และเลาจนา เขาวานาศัย. 2544. **ความหลากหลายของสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่พบในประเทศไทยและประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช**. รายงานการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

จริยา จันทรไพแสง, ยุพา มงคลสุข และสุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์. 2550. **การพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ไทย**. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, _____, _____ และประสิทธิ์ คีวินวงศ์. 2547. **เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการโครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้แบคทีเรียบีทีจากงานวิจัยสู่เกษตรกร**. อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

จันทิมา เจียมวิจิตร. 2545. **สูตรสำเร็จเชื้อ *Bacillus* spp. MK 007 สำหรับการควบคุมเชื้อรา *Curvularia lunata* สาเหตุโรคเมล็ดดำของข้าว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณรรฐพล วัลลีย์ลักษณ์. ม.ป.ป. **แมลงศัตรูผักของประเทศไทย**. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

คุณิ ณะบริพัฒน์. 2537. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2535. โรควิทยาของแมลง. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

นรินทร์ สมบูรณ์สาร. 2544. หนอนไหมฝรั่ง. กองส่งเสริมพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชรี ศรี, ทศนีย์ แจ่มจรรยา และนิวัฒน์ มนต์สันเทียะ. 2540. แมลงเบียนหนอนกระทู้ผัก *Apanteles* sp. ว. กัญ. สัตว. 19 (1): 21-30.

ปทุมพร นิมนเอก และจรียา จันทร์ไพแสง. 2541. การผลิต *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* เพื่อใช้ควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Heliothis armigera* Hubner) โครงการย่อยที่ 1 กระบวนการหมักที่เหมาะสมในการผลิต *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* เพื่อใช้ควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Heliothis armigera* Hubner). รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประกาย เทพหาร. 2549. ความหลากหลายของสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่พบในจังหวัดกระบี่ และประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์. 2541. การศึกษาการเติบโต การสร้างสปอร์ และกิจกรรมเอนไซม์ของ *Bacillus thuringiensis*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรีชา อารีกุล. 2536. การศึกษาการอนุรักษ์ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูถั่วเขียว, น. 83-86. ใน รายงานการประชุมวิชาการประจำปี. ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

เขวลักษณ์ พุจิตรกานนท์. 2548. คุณลักษณะของยีน *cry 1* ที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนจาก *Bacillus thuringiensis* JC590. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภัทรภรณ์ โสมนัส. 2536. การใช้มุ้งตาข่ายในลอนร่วมกับสารสกัดสะเดาในการป้องกันและกำจัดแมลงศัตรูผักคะน้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

- วินัย รัชตปกรณ์ชัย. 2535. แมลงศัตรูพืชผักตระกูลกะหล่ำและแนวทางการบริหาร, น. 142-152.
 ใน แมลงและสัตว์ศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจและการบริหาร. กองกัญและสัตววิทยา
 กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- ศานิต รัตนกุมมะ. 2546. กีฏวิทยาแม่บท. สิรินาฏการพิมพ์, เชียงใหม่.
- สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2526. แมลงศัตรูพืชทางการเกษตรของประเทศไทย. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์,
 กรุงเทพฯ.
- อุดมพร แฝงนคร. 2528. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากสะเดาที่มีต่อหนอนกระทู้หอม
Spodoptera exigua Hubner และหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (F.). วิทยานิพนธ์
 ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อุษณีย์ ยิ่งยงทรัพย์มัน. 2549. การพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์ของ *Bacillus thuringiensis* JC590 เพื่อใช้
 ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อัจฉรา ตันติโชคก. 2544. ปีที่ การควบคุมแมลงศัตรูพืช, น. 183-208. ใน เอกสารวิชาการควบคุม
 แมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **J. Econ.**
Entomol. 18: 265-267.
- Angus, T.A. 1956. Association of toxicity with protein-crystalline inclusions of *Bacillus sotto*
 Ishiwata. **Can. J. Microbiol.** 2: 122-131.
- Aronson A.I, E.S. Han, W. McGaughey and D. Johnson. 1991. The solubility of inclusion
 proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a
 factor in toxicity to insects. **Appl Environ Microbiol.** 57: 981-986.

- Beebee, T.J.C. and R.P.M. Bond. 1973. Effect of the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* on normal and ecdyson-stimulated ribonucleic acid polymerase activity in intact nuclei from the fat body of *Sarcophaga bullata* larvae. **Biochem. J.** 136: 1-7.
- Beegle, C.C. and T. Yamamoto. 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Can. Entomol.** 124: 587-616.
- Benoit, T.G., K.A. Newman and G.R. Wilson. 1995. Correlation between alkaline activation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* spores and crystal production. **Curr. Microbiol.** 31: 301-303.
- Bernhard, K. and R. Utz. 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses, pp. 255-267. In P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs, eds. ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and practice.** Chichester, New York, Toronto.
- _____, P.J. Holloway and H.D. Burges. 1998. Appendix I : A Catalogue of Formulation Additives : Function, Nomenclature, Properties and Supplies, pp. 333-336. In H.D. Burges, ed. **Formulation of microbial biopesticide: beneficial micro-organisms, nematode and seed treatments.** Dordrecht, Netherland: Kluwer Academic Publishers, London.
- _____, P. Jarrett, M. Meadows, J. Butt, D.J. Eills, G.M. Roberts, S. Pauli, P. Rodgers and H.D. Burges. 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization and activity against insect pests. **J. Invertebr. Pathol.** 70: 59-68.
- Bin-Cheng Zhang. 1994. **Index of Economically Important Lepidoptera.** CAB international, UK.

Bonefoi, A. and H. de Barjac. 1963. Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la détermination de l'antigène flagellaire. **Entomophaga**. 8: 223-229.

Boucias, D.G. and J.C. Pendland. 1998. **Principles of insect pathology**. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts.

Brar, S.K., M. Verma, R.D. Tyagi and J.R. Valéro. 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**. 41: 323-342.

_____, _____, _____, _____ and R.Y. Surampalli. 2005. Starch Industry Wastewater-Based Stable *Bacillus thuringiensis* Liquid Formulations. **J. Econ. Entomol.** 98: 1890-1898.

_____, _____, _____, _____, _____, S. Barnabé and J.R. Valéro. 2007. *Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism. **Process Biochemistry**. 42: 773-790.

Burges, H.D. and K.A. Jones. 1998. Formulation of Bacteria, Viruses and Protozoa to control insects, pp. 33-127. In H.D. Burges, ed. **Formulation of microbial biopesticide: beneficial micro-organisms, nematode and seed treatments**. Dordrecht, Netherland: Kluwer Academic Publishers, London.

_____ and N.W. Hussey. 1971. **Microbial Control of Insects and Mites**. Academic Press, New York.

Carpenter, J.E. and L.P. Gianessi. 2001. **Agricultural biotechnology: Updated benefit estimates**. In: *National Center for Food and Agricultural Policy*. Washington, DC.

Caulder, J. 1999. The North American Scenario, pp. 13-21. *In* F.R. Hall and J.J. Menn, eds.

Method in biotechnology, vol 5: Biopesticides: Use and Delivery. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Chilcott, C.N. and P.J. Wigley. 1994. Opportunities for finding new *Bacillus thuringiensis* strain. **Agric Ecosystem Environ.** 49: 51-57.

Crickmore, N. and D.J. Wright. 2001. Cry1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is Toxic to the Diamondback Moth, *Plutella xylostella*, and Synergizes the Activity of Cry1Ac towards a Resistant Strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 5859-5861.

_____, D.R. Zeigler, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, A. Bravo and D.H. Dean. 2008. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature.** Source: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, August 8, 2008.

_____, _____, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, D.H. Dean, T.L. Couch and C.M. Ignoffo. 1981. Formulation in insect pathogens, pp. 621-34. *In* H.D. Burges, ed. **Microbial Control of Pests and Plant Diseases.** Academic Press, London.

Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62: 807-813.

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

_____ and F. Lemille. 1970. Presence of flagellar antigenic subfactors in serotype 3 of *Bacillus thuringiensis*. **J. Invertebr. Pathol.** 15: 139-140.

- de Maagd, R.A. and S. Naimov. 2003. **Transgenic potatoes resistant to coleopteran pests through the use of single hybrid *Bacillus thuringiensis cry* gens**. Source: http://www.isb.vt.edu/news/2003/new_03.Jul.htm, August 10, 2006.
- _____, A. Bravo and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends Genet.** 17: 193-199.
- Devisetty, B.H. 1988. **Microbial Formulations-Opportunities and Challenges, In Pesticide Formulations and Application Systems**. ASTM STP98. 8, American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Dulmage, H.T. 1970. Insecticide activity of HD -1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **J. Invertebr. Pathol.** 15:232-239.
- Ejiofor, A.O. and N. Okafor. 1991. Formulation of a Flowable Liquid Concentrate of *Bacillus thuringiensis* Serotype H-14 Spores and Crystal as mosquito Larvicide. **J. Appl. Bacteriol.** 71: 202-6.
- Enwistle, P.F., J.S. Cony, M.J. Bailey and S. Higgs. 1993. ***Bacillus thuringiensis*, and Environmental Biopesticide: Theory and Practice**. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- EPA. 2001. **Off. Pestic. Programms, Biopesticides, and Pollut. Prev. Div. Biopesticides Registrstion Action Document; Revised Risks and Benefits Sections: *Bacillus thuringiensis* Plant Pesticides**. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Estruch, J. J., G.W. Warren, M.A. Mullins, G.J. Nye, J.A. Craig and M.G. Koziel. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93: 5389-5394.

- Farghal, A.I. and Y.A. Darwish. 1988. Effect of storage temperature on the insecticidal activity of a wettable powder formulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on *Culex pipiens molestus* larvae. **Anz. Schädlingsskde, Pflanzenschutz, Umweltschutz**. 61: 31-33.
- Federici, B.A. 2005. Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. **J. Invertebr. Pathol.** 89: 30-38.
- Feitelson, J.S. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree, p. 63-71. In L. Kim, ed. **Advanced engineered pesticides**. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- _____, J. Payne and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**. 10: 271-275.
- GIFAP. 1989. **Catalogue of pesticide Formulation Types and International Coding System**. GIFAP Technical Monograph No. 2, Brussels.
- Goldberg, L.J. and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosq. News**. 37: 355-358.
- Heimpel, A.M. 1963. Disease cause by certain spore forming bacteria, pp. 21-73. In E.A. Steinhaus, ed. **Insect Pathology; An Advance Treatise**. Vol. 2. Academic Press, New York.
- Heimpel, A.M. and T.A. Angus. 1959. The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. **J. Insect Pathol.** 1:152-170.
- Henderson, C.F. and E. W. Tilton. 1955. Tests with acaricides against the brow wheat mite. **J. Econ. Entomol.** 48: 157-161.

- Hickle, L.A. and W.L. Fitch. 1990. Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*: An Overview, pp. 1-8. In L.A. Hickle and W.L. Fitch, eds. **Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis***, American Chemical Society, Washington D.C.
- Höfte, H. and H.R. Whiteley 1989. Insecticidal Crystal Protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.** 53: 242-255.
- Honée, G and B. Visser. 1993. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Entomol. Exp. Appl.** 69: 145-155.
- Hou, R.C.W., M.Y. Lin, M.M.C. Wang and J.T.C. Tzen. 2003. Increase of Viability of Entrapped Cells of *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus* in Artificial Sesame Oil Emulsions. **J. Dairy Sci.** 86: 422-428.
- Howse, P.E., I.D.R. Stevens and O.T. Jones. 1998. **Insect Pheromones and their Use in Pest Management**. Chapman & Hall, London.
- Jensen, G.B., B.M. Hansen, J. Eilenberg and J. Mahillon. 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. **Environ. Microbiol.** 5: 631-640.
- Jones, K.A. and H.D. Burges. 1998. Technology of formulation and application, pp. 7-30. In H.D. Burges, ed. **Formulation of microbial biopesticide: beneficial micro-organisms, nematode and seed treatments**. Dordrecht, Netherland: Kluwer Academic Publishers, London.
- Khetan, S.K. 2001. **Microbial Pest Control**. Marcel Dekker Inc., New York.
- Knowles, B.H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Adv. Insect Physiol.** 24: 275-308.

- Kononenko, V.S. 1990. Synonymic check list of the Noctuidae of the Primorye Territory the far east of U.S.S.R. **Tinea**. 13: 1-40.
- Krieg, A., A.M. Huger, G.A. Langenbruch and W. Schnetter. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. **J. Appl. Entomol.** 96: 500-508.
- Kuroko, H. and A. Lewvanich. 1993. **Lepidopterous Pests of Tropical Fruit Trees in Thailand**. Japan International Cooperation Agency, Japan.
- Lacey, L.A. 1985. Effects of pH and Storage Temperature on Spore Viability and Larvicidal Activity of *Bacillus thuringiensis*. **Bull. Soc. Vector. Ecol.** 10: 102-6.
- _____ and A.H. Undeen. 1986. Microbial control of black flies and mosquitoes. **Annu. Rev. Entomol.** 31: 265-296.
- Lambert, B. and M. Peferone. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. **Bio. Sci.** 42: 112-122.
- Lecadet, M.M., E. Frachon, V.C. Dumanoir, H. Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent and I. Thiery. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. **J. Appl. Microbiol.** 86: 660-672.
- Lee, M., D. Bae, D. Lee, K. Jang, D. Oh and S. Ha. 2006. Reduction of *Bacillus cereus* in cooked rice treated with sanitizers and disinfectants. **J. Microbiol. Biotechnol.** 16: 639-642.

- Levinson, B.L. 1990. High-performance liquid chromatography analysis of two beta-exotoxins produced by some *Bacillus thuringiensis* strains, pp. 115-136. In L.A. Hickie and W.L. Fitch, eds. **Analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis***. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Lewis, F.B., N.R. Dubois, D. Grimble, W. Metterhouse and J. Quimby. 1974. Gypsy moth: Efficacy of aerially-applied *Bacillus thuringiensis*. **J. Econ. Entomol.** 67: 351-354.
- Lisansky, S.G. 1985. Production and commercialization of pathogen, pp. 210-218. In H.W. Hussey, ed. **Biological pest control**. Dorset, Blandford Press, UK.
- _____, R.J. Quinlan and G. Tassoni. 1993. **The *Bacillus thuringiensis* Production Handbook**. CPL Press, Newbury.
- Luthy, P. and M.G. Wolfersberger. 2000. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* Toxins, pp. 167-180. In J. F. Charles, A. Delécluse and C. Nielsen-Leroux, eds. **Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland.
- Martin, P.A. and R.S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 2437-2442.
- McConnell, E. and A.G. Richards. 1959. The Production by *Bacillus thuringiensis* (Berliner) a heat-stable substance toxic for insect. **Can. J. Microbiol.** 1:161-168.
- Moore, D., O.K. Douro-Kpindou, N.E. Jenkins and C.J. Lomer. 1996. Effects of Moisture Content and Temperature on Storage of *Metarhizium flavoviride* Conidia. **Biocontrol Sci. Technol.** 6: 51-61.

- Moyes, R. And R. Droleskey. 2007. **Endospore and Parasporal Body Formation by *Bacillus thuringiensis***. Source: <http://www.microbelibrary.org/>, August 6, 2008.
- Narayanan, K.S., R.M. Ianniello and D.W. Pritchard. 1997. UV Protective aqueous Emulsion and Emulsifiable Solids for Cosmetic and Agrichemical Formulations. **US Patent** 5,597,574.
- Nishiitsutsuji-Uwo, J. and Y. Endo. 1980. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: General characteristics of intoxicated *Bombyx* larvae. **J. Invertebr. Pathol.** 35: 219-228.
- Nunez-Valdez, E. 1997. *Bacillus thuringiensis* conference in Thailand: A widening “umbrella”. **Nature Biotechnol.** 15: 225-226.
- Paau, S.A. 1988. Formulations useful in applying beneficial microorganisms to seeds. **Tibtech.** 6: 276-279.
- Poojitkanont, Y., S. Keawsompong and J. Chanpaisaeng. 2008. Identification and Characterization of cry Genes Coding for Insecticidal Crystal Protein in *Bacillus thuringiensis* JC590. **Kasetsart J. (Nat. Sci).** 42: 51-60.
- Quinlan, R.J. and S.G. Lisansky. 1983. Microbial Insecticides, pp. 233-254. In H. Delweg, ed. **Biotechnology**. Verlag Chemie, Basel.
- Raymond, M. 1985. Présentation d’ un programme d’ analyse log-probit pour micro-ordinateur. **Cah. ORSTOM. Sé. Ent. med et Parasitol.** 22: 117-121.
- Rhodes, D.J. 1993. Formulation of biological control agents, pp. 411-439. In D.G. Jones, ed. **Exploitation of Microorganisms**. Chapman & Hall, London.

- Roberto, T.A., R.P. Bateman, G. Jane, P. Chris and R.S. Leather. 2002. Effects of Different Formulations on Viability and Medium-Term Storage of *Metarhizium anisopliae* Conidia. **Neotrop. Entomol.** 31(1): 91-99.
- Roh, J.Y., J.Y. Choi, M.S. Li, B.R. Jin and Y.H. Je. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control. **J. Microbiol. Biotechnol.** 17(4): 547-559.
- Rowe, G.E. and A. Margaritis. 2004. Bioprocess Design and Economic Analysis for the Commercial Production of Environmentally Friendly Bioinsecticides from *Bacillus thuringiensis* HD-1 kurstaki. **Biotechnol. Bioeng.** 86(4): 377-88.
- Rukmini, V., C.Y. Reddy and G. Venkateswerlu. 2000. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. **Biochimie.** 82: 109-116.
- Steinhaus, E.A. 1961. On the Correct author of *Bacillus sotto*. **J. Insect Pathol.** 3: 97-100.
- Sundaram, A., J.W. Leung and B.N. Devisetty. 1993. Rain-Fastness of *Bacillus thuringiensis* Deposits on Conifer Foliage, pp. 227-41. In P.D. Berger, B.N. Devisetty and F.R. Hall, eds. **Pesticide Formulations and Application Systems**, 13. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Taborsky, V. 1992. Small-Scale Processing of Microbial Pesticides. **FAO Agricultural Services Bulletin No.96**, University of Agriculture Prague, Czechoslovakia.
- Tamez-Guerra, P., C. Garcia-Gutiérrez, H. Medrano-Roldán, L.J. Galán-Wong and C.F. Sandoval-Coronado. 1999. Spray-dried microencapsulated *Bacillus thuringiensis* formulations for the control of *Epilachna varivestis* Mulsant. **Southwestern Entomologist.** 24: 37-48.

- Tanada, Y. and H.K. Kaya. 1993. **Insect Pathology**. Academic Press Inc., London.
- Tomlin, C.D.S. 1997. **The pesticide manual, 11th ed.** Farnham, Surrey, British Crop Protection Council.
- Vieira, F.C.S. and E. Nahas. 1998. Microbial Count of Dark Red Latosol Sample Stored at Different Temperatures. **Revista de Microbiologia**. 29: 159-163.
- Warren, R.E., D. Rubenstein, D.J. Ellar, J.M. Kramer and R.J. Gilbert. 1984. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: Protoxin activation and safety. **Lancet: March**. 24: 678-679.
- Whalon, E.A. and B.A. Wingerd. 2003. Bt: mode of action and use. **Arch Insect Biochem Physiol**. 54(4): 200-211.
- Zhong, C., D.J. Ellar, A. Bishop, C. Johnson, S. Lin and E.R. Hart. 2000. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin which is toxic to insects in three orders. **J. Invertebr. Pathol**. 76: 131-139.
- Ziwen, Y. 2002. **The fate of *Bacillus thuringiensis* insecticides in China**. Source: <http://unesco.biotec.or.th/regional.asp>, March 10, 2007.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและการย้อมสีแบคทีเรีย

1. การเตรียมอาหาร

Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH	7.0	(ปรับ pH ด้วย 0.1 N NaOH หรือ 0.1 N H ₃ PO ₄)

Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH	7.0	(ปรับ pH ด้วย 0.1 N NaOH หรือ 0.1 N H ₃ PO ₄)

อาหารบีเอ็กซ์

น้ำอามิ-อามิ	5	เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัมต่อลิตร
pH	7.0	(ปรับ pH ด้วย 0.1 N NaOH หรือ 0.1 N H ₃ PO ₄)

2. การย้อมสีแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

1. เกลี่ยเชื่อบนสไลด์ให้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ทิ้งไว้ให้แห้ง
2. ตรึงเชื้อให้ติดแน่นบนแผ่นสไลด์ด้วยการผ่านไอบนเปลวไฟ
3. หยดสี saturated malachite green ให้ทั่วมบริเวณที่เกลี่ยเชื้อไว้ ให้ความร้อนโดยใช้ตะเกียงแอลกอฮอล์จนได้สไลด์ ระวังอย่าให้สีเดือดและแห้งเกินไป โดยคอยเติมสีอยู่ตลอด ให้ความร้อนเช่นนี้นานประมาณ 10 นาที จากนั้นล้างสีออกด้วยน้ำ โดยให้น้ำไหลผ่านจนกระทั่งน้ำที่ล้างไม่มีสีเขียวออกมา ทิ้งไว้ให้สีแห้งหมาดๆ
4. ย้อมซ้ำบริเวณที่เกลี่ยเชื้อด้วยสี safranin O นาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำไหล ทิ้งไว้ให้แห้ง
5. นำสไลด์มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง จะพบเซลล์และผลึกโปรตีนติดสีแดงของ safranin O และสปอร์จะติดสีเขียวของ malachite green

ภาคผนวก ข
การคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆ

ตารางผนวกที่ ข 1 จำนวนเซลล์และสปอร์ทั้งหมด หลังการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 1, 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52 และ 60 วัน

วันที่เก็บรักษา	สูตร	จำนวนเซลล์ทั้งหมด x 10 ⁷		ค่าเฉลี่ย x 10 ⁷	เปอร์เซ็นต์	จำนวนสปอร์ทั้งหมดทั้งหมด x 10 ⁷		ค่าเฉลี่ย x 10 ⁷	เปอร์เซ็นต์
		(cfu/ml)				(cfu*/ml)			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2			(cfu/ml)	ที่เหลือ		
0	1	278	231	254.5	100.00	89	65	77	100.00
	2	245	264	254.5	100.00	102	112	107	100.00
	3	134	121	127.5	100.00	88	78	83	100.00
1	1	265	242	253.5	99.61	65	60	62.5	81.17
	2	254	221	237.5	93.32	97	101	99	92.52
	3	112	134	123	96.47	78	77	77.5	93.37
7	1	152	131	141.5	55.60	42	21	31.5	40.91
	2	146	168	157	61.69	73	51	62	57.94
	3	128	93	110.5	86.67	41	42	41.5	50.00
15	1	54	31	42.5	16.70	12	11	11.5	14.94
	2	46	58	52	20.43	13	21	17	15.89
	3	41	83	62	48.63	28	24	26	31.32
22	1	33.6	30	31.8	12.50	9	4.2	6.6	8.57
	2	27.2	15.3	21.25	8.35	9	5	7	6.54
	3	36.2	31.3	33.75	26.47	6.2	7.3	6.75	8.13

ตารางผนวกที่ ข 1 (ต่อ)

วันที่เก็บรักษา	สูตร	จำนวนเซลล์ทั้งหมด x 10 ⁷		ค่าเฉลี่ย x 10 ⁷	เปอร์เซ็นต์	จำนวนสปอร์ทั้งหมด x 10 ⁷		ค่าเฉลี่ย x 10 ⁷	เปอร์เซ็นต์
		(cfu/ml)				(cfu*/ml)			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2			(cfu/ml)	ที่เหลือ		
30	1	34.8	28	31.4	12.34	2.3	2.6	2.45	3.18
	2	22	30.5	26.25	10.34	8.7	5.2	6.95	6.50
	3	31	32.8	31.9	25.02	4.8	5.9	5.35	6.44
37	1	35	30	32.5	12.77	7.8	4.9	6.35	8.25
	2	23.5	11.5	17.5	6.88	2.3	2.4	2.35	2.20
	3	23.1	20.8	21.95	17.22	5.4	9.3	7.35	8.86
45	1	15.3	12.5	13.9	5.46	3.3	1.2	2.25	2.92
	2	21.8	18.2	20	7.86	9.1	7.1	8.1	7.57
	3	15.3	14.3	14.8	11.61	8.6	9.1	8.85	10.66
52	1	26.3	24.6	25.45	10.00	3.6	1.2	2.4	3.12
	2	26.2	27.2	26.7	10.49	1.5	1.4	1.45	1.36
	3	28.8	25.1	26.95	21.14	3.6	5.3	4.45	5.36
60	1	11	26	18.5	7.27	8	14	11	14.28
	2	31	39	35	13.75	12	12	12	11.21
	3	31	24	27.5	21.57	11	14	12.5	15.06

ตารางผนวกที่ ข 2 จำนวนและเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) หลังจากได้รับผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

วันที่เก็บ รักษา	สูตร	จำนวนหนอนที่ตาย (ตัว)					รวม (ตัว)	เปอร์เซ็นต์ การตาย (%)
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5		
1	1	10	10	9	10	10	49	94.00
	2	10	7	10	7	9	43	98.00
	3	10	10	10	10	10	50	86.00
7	1	5	9	6	8	9	37	84.85
	2	8	8	6	9	7	38	72.73
	3	10	10	10	10	10	50	74.75
15	1	8	9	4	7	6	34	79.59
	2	10	5	8	6	7	36	65.31
	3	10	10	10	10	10	50	69.94
22	1	9	9	10	5	7	40	63.92
	2	10	7	8	7	10	42	76.29
	3	10	10	10	10	10	50	80.04
30	1	8	4	4	9	6	31	58.58
	2	8	8	6	9	7	38	60.61
	3	10	10	10	10	10	50	74.75
37	1	8	7	7	7	7	36	69.39
	2	0	8	10	8	7	33	69.39
	3	10	10	10	10	10	50	63.26
45	1	7	8	3	4	8	35	78.00
	2	6	6	2	5	7	26	70.00
	3	10	10	10	10	10	50	52.00
52	1	5	8	6	5	5	29	56.00
	2	5	4	2	4	4	19	58.00
	3	10	10	10	10	10	50	38.00
60	1	1	3	1	2	2	9	34.34
	2	4	3	1	3	0	11	16.16
	3	10	10	10	10	10	50	20.20

ตารางผนวกที่ ข 3 จำนวนหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) ที่ตาย หลังจากได้รับ
ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* JC590 ทั้ง 3 สูตร ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ
เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

วันที่ เก็บรักษา	สูตร	ความเข้มข้น	จำนวนหนอนที่ตาย (ตัว)					รวมทั้งหมด (ตัว)
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	
1	1	10^8	3	7	9	6	7	32
		10^7	3	10	8	6	2	29
		10^6	5	5	2	7	8	27
		10^5	6	8	2	6	0	22
	2	10^8	8	9	9	10	10	46
		10^7	2	9	8	9	10	38
		10^6	9	6	8	6	6	35
		10^5	3	4	5	1	4	17
	3	10^8	9	8	7	3	5	32
		10^7	6	4	5	4	7	26
		10^6	3	4	5	6	4	22
		10^5	2	2	6	3	0	13
7	1	10^8	9	9	6	9	8	41
		10^7	9	7	5	8	9	38
		10^6	5	7	4	4	6	26
		10^5	1	2	1	1	3	9
	2	10^8	6	8	5	7	5	31
		10^7	6	6	5	9	1	27
		10^6	3	7	6	5	8	29
		10^5	6	2	3	2	3	16
	3	10^8	4	10	7	9	7	37
		10^7	1	4	1	9	10	25
		10^6	4	3	4	6	4	21
		10^5	1	0	3	3	8	15

ตารางผนวกที่ ข 3 (ต่อ)

วันที่ เก็บรักษา	สูตร	ความเข้มข้น	จำนวนหนอนที่ตาย (ตัว)					รวมทั้งหมด (ตัว)
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	
15	1	10^7	7	8	8	8	8	39
		10^6	6	7	5	8	3	29
		10^5	7	8	6	5	7	26
		10^4	5	5	3	3	0	16
	2	10^7	6	8	4	5	7	30
		10^6	4	5	4	3	7	23
		10^5	1	6	5	3	2	17
		10^4	8	4	2	1	5	20
	3	10^7	7	4	8	5	6	30
		10^6	4	6	1	8	10	29
		10^5	6	2	8	3	0	19
		10^4	2	2	3	3	3	10
22	1	10^7	8	8	6	5	4	31
		10^6	7	7	4	3	4	25
		10^5	3	3	2	2	6	16
		10^4	1	4	1	2	1	9
	2	10^7	3	7	8	5	10	33
		10^6	5	4	10	2	4	25
		10^5	1	4	5	4	0	14
		10^4	1	2	2	1	4	10
	3	10^7	7	2	5	5	8	27
		10^6	6	2	5	7	7	27
		10^5	4	3	2	1	2	12
		10^4	1	0	4	3	0	8

ตารางผนวกที่ ข 3 (ต่อ)

วันที่ เก็บรักษา	สูตร	ความเข้มข้น	จำนวนหนอนที่ตาย (ตัว)					รวมทั้งหมด (ตัว)
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	
30	1	10^7	6	9	5	3	4	27
		10^6	5	3	3	3	3	17
		10^5	2	2	3	4	2	13
		10^4	2	2	2	0	1	7
	2	10^7	10	9	9	4	1	32
		10^6	4	5	8	2	4	23
		10^5	6	1	5	3	4	19
		10^4	4	2	6	3	2	17
	3	10^7	8	8	6	5	7	34
		10^6	1	3	2	6	8	20
		10^5	4	4	2	5	0	15
		10^4	1	0	3	4	1	9
37	1	10^7	5	3	4	6	6	24
		10^6	6	2	2	4	6	20
		10^5	2	6	6	3	2	19
		10^4	2	1	3	2	2	10
	2	10^7	9	6	8	7	5	35
		10^6	7	8	3	4	8	35
		10^5	4	1	5	4	6	20
		10^4	2	2	2	3	4	13
	3	10^7	7	5	9	7	2	30
		10^6	1	7	9	4	7	28
		10^5	1	5	1	6	5	18
		10^4	1	3	2	6	8	20

ตารางผนวกที่ ข 3 (ต่อ)

วันที่ เก็บรักษา	สูตร	ความเข้มข้น	จำนวนหนอนที่ตาย (ตัว)					รวมทั้งหมด (ตัว)
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	
45	1	10^7	6	6	6	5	7	30
		10^6	3	6	3	7	6	25
		10^5	8	4	5	1	1	19
		10^4	3	2	3	2	2	14
	2	10^7	8	5	4	5	4	26
		10^6	8	2	1	5	5	21
		10^5	2	2	2	3	4	13
		10^4	3	6	2	1	2	14
	3	10^7	5	3	10	4	4	26
		10^6	7	1	5	5	6	24
		10^5	1	3	9	9	3	25
		10^4	6	0	6	3	4	19
52	1	10^7	3	4	2	3	2	14
		10^6	2	4	4	1	3	14
		10^5	3	3	2	1	2	11
		10^4	3	3	1	1	0	8
	2	10^7	3	5	0	4	3	15
		10^6	1	3	2	2	2	10
		10^5	3	1	3	1	1	9
		10^4	3	1	3	2	0	9
	3	10^7	3	2	3	3	3	14
		10^6	5	0	3	3	1	12
		10^5	3	2	3	2	2	12
		10^4	1	0	0	0	0	1

ตารางผนวกที่ ข 3 (ต่อ)

วันที่ เก็บรักษา	สูตร	ความเข้มข้น	จำนวนหนอนที่ตาย (ตัว)					รวมทั้งหมด (ตัว)
			ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	
60	1	10^7	3	5	0	2	1	11
		10^6	2	1	2	1	2	8
		10^5	0	0	0	2	1	3
		10^4	0	0	3	0	0	3
	2	10^7	0	0	0	2	1	3
		10^6	0	0	0	1	1	2
		10^5	0	1	0	0	0	1
		10^4	0	0	0	0	0	0
	3	10^7	3	0	3	2	2	10
		10^6	3	2	1	3	2	11
		10^5	2	1	1	2	0	6
		10^4	0	1	1	0	0	2

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวตุลยา กลับแก้ว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 29 ธันวาคม 2524
สถานที่เกิด	พัทลุง
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (การจัดการศัตรูพืช) คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2547)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาประจำปี งบประมาณปี พ.ศ. 2549