

ตัวอย่าง อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

1. แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 27 สายพันธุ์

1. *Bacillus thuringiensis aizawai*
2. *Bacillus thuringiensis alesti*
3. *Bacillus thuringiensis canadensis*
4. *Bacillus thuringiensis caucasicus*
5. *Bacillus thuringiensis dakota*
6. *Bacillus thuringiensis darmstadiensis*
7. *Bacillus thuringiensis dendrolimus*
8. *Bacillus thuringiensis entomocidus*
9. *Bacillus thuringiensis finitimus*
10. *Bacillus thuringiensis galleriae*
11. *Bacillus thuringiensis israelensis* H. 14
12. *Bacillus thuringiensis indiana*
13. *Bacillus thuringiensis kenyae*
14. *Bacillus thuringiensis kumamotoensis*
15. *Bacillus thuringiensis kurstaki*
16. *Bacillus thuringiensis kyushuensis*
17. *Bacillus thuringiensis morrisoni*
18. *Bacillus thuringiensis ostrinae*
19. *Bacillus thuringiensis pakistani*
20. *Bacillus thuringiensis sotto*
21. *Bacillus thuringiensis subtoxicus*
22. *Bacillus thuringiensis thompsoni*

23. *Bacillus thuringiensis thuringiensis* H. 1
24. *Bacillus thuringiensis tochiensis* i
25. *Bacillus thuringiensis tohokuensis*
26. *Bacillus thuringiensis tolworthi*
27. *Bacillus thuringiensis toumanoffi*

2. แมลงที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1 หนอนผีเสื้อกินใยฝั่ขนาดเล็ก (*Achroia grisella* F.)
- 2.2 หนอนผีเสื้อกินใยฝั่ขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella* L.)

3. อาหารสำหรับตัวหนอน

อาหารสำหรับหนอนผีเสื้อทั้ง 2 ชนิด ใช้อาหารเทียมดัดแปลงจากสูตร Haydak's medium (Duxty, 1982; USDA, 1970) ซึ่งประกอบด้วย

1. นมผง
2. glycerol (กลีเซอรอล)
3. น้ำกลั่น
4. ใยฝั่
5. เกสรฝั่

4. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมีดังนี้

1. Nutrient agar (NA) ที่ pH 7.8 ซึ่งประกอบด้วย

- Peptone 10 g
- Beewax truct 3 g
- NaCl 5 g
- Agar 18-20 g
- Distilled water 1000 ml

2. Tryptic Soy Broth (Difco) สูตรอาหารสำเร็จรูป

3. อาหารสูตร NBSG (Nutrient broth supplement with salt and glucose) ซึ่งประกอบด้วย

- Nutrient broth	40 g
- CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.4 g
- MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.25 g
- ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.025 g
- CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025 g
- Glucose	10 g
- Agar	110 g
- Distilled water	5000 ml

5. วัสดุและอุปกรณ์

1. petridish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร และ 2 เซนติเมตร
2. หลอดทดลองขนาด 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร
3. เครื่องกวนสารแท่งแม่เหล็กไฟฟ้า (stirrer)
4. บีเปตต์
5. บีกเกอร์ขนาด 15, 50, 100, 250 และ 1000 ลูกบาศก์เซนติเมตร
6. กระบอกตวง (measuring cylinder) ขนาด 50 และ 100 ลูกบาศก์มิลลิเมตร
7. เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ (hygrometer)
8. ออกคิวลาร์ ไมโครมิเตอร์ (ocular micrometer)
9. เทอร์โมมิเตอร์
10. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
11. ปากคีบสำหรับจับตัวหนอน (forcep)
12. หลอดหยดสาร (dropper)
13. ขวดแม่โขงแบน
14. เครื่องทำแห้ง (lyophilizer)
15. เครื่อง centrifuge
16. ตู้เย็น
17. เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า

18. ครกบดสาร
19. ตู้อบฆ่าเชื้อ (oven)
20. กล่องพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 และ 10 เซนติเมตร
21. ชั้นวางของ
22. กระดาษวัดค่า pH
23. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereomicroscope - Bausch & Lomb)
24. autoclave
25. foil paper
26. NaCl 0.85%
27. แผ่นรวงรังผึ้ง
28. รอยัลเลสลี่
29. ซ้อนตัดสาร
30. ลวดเขี่ยเชื้อ

6. ขั้นตอนการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

โดยได้รับความอนุเคราะห์สายพันธุ์ของแบคทีเรีย *B. thuringiensis* ทั้ง 27 สายพันธุ์ จากกองกึ่งวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

ขั้นตอนที่ 1. การเตรียมเชื้อให้บริสุทธิ์

1. นำเชื้อ *B. thuringiensis* จาก stock culture มาเลี้ยงในอาหาร enrichment media (tryptic soy broth) ที่ pH 7.4-7.6 ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น stock ในครั้งต่อไป
2. เขี่ยเชื้อลงใน agar plate โดยใช้สูตรอาหาร Nutrient agar เลี้ยงใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อต้องการแยกเชื้ออีกครั้งหนึ่ง
3. แยกเชื้อบริสุทธิ์ลงใน nutrient agar slant เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อไป

ขั้นตอนที่ 2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดลอง

1. ถ่ายเชื้อจากขั้นตอนที่ 1 ลงในหลอดแก้วที่มีอาหารสูตร tryptic soy broth เลี้ยงใน incubator อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ถ่ายเชื้อจากหลอดแก้วลงใน media plate ที่อยู่ในขวดแม่โขงแบนโดยใช้สูตรอาหาร NASG เลี้ยงในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 วัน
3. เก็บเชื้อจากขวดแม่โขงโดยใช้ NaCl 0.85 % ละลายเชื้อออกจากขวด
4. นำเชื้อที่ได้ไป centrifuge ที่ 3,000 rpm/min เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แยกส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง
5. นำเชื้อที่แยกได้ไป freeze ที่อุณหภูมิ -77 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. นำเชื้อที่ freeze แล้วไปเข้าเครื่อง lyophilizer เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำให้เชื้อแห้ง
7. นำเชื้อที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียด เก็บเชื้อไว้ในขวดโดยไม่ให้ความชื้นเข้าได้ เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

7. การเพาะเลี้ยงหนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งขนาดเล็ก (*Achrota grisella* F.) และหนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งขนาดใหญ่ (*Galleria Mellonella* L.)

เก็บหนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งจากการเข้าทำลายแผ่นรวงรวงของฝิ่งในธรรมชาติจาก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ สถานีวิจัยชีววิทยาของฝิ่ง ต. บางชันแตก อ. เมือง จ. สมุทรสงคราม มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ หน่วยชีววิทยาของฝิ่ง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อุณหภูมิห้อง จนหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัย แยกเอาตัวเต็มวัยของผีเสื้อแต่ละชนิดออกมา จับให้ผสมพันธุ์กันโดยการจับเพศผู้และเพศเมียจำนวน 5-8 คู่ มาใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 7 X 9 X 5 เซนติเมตร (กว้างXยาวXสูง) ที่มีกระดาษรองเพื่อเป็นที่วางไข่ จากนั้นแยกเอาไข่มาเลี้ยงในอาหารที่ดัดแปลงจากสูตร Haydak's medium (Daxly et al. 1982; USDA, 1970) จนตัวหนอนเข้าสู่ระยะ 3 จึงแยกตัวหนอนออกมาเลี้ยงอาหารใหม่เพื่อไม่ให้ประชากรหนาแน่นเกินไป และเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกครั้งที่เห็นว่าอาหารเริ่มหมดแล้ว โดยใช้อาหารสูตรเดียวตลอดการเจริญเติบโตของตัวหนอน

8. การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ทั้งหมดที่มีพิษสูงต่อหนอนผีเสื้อกินใบ ผีเสื้อขนาดเล็ก (*Achrois grisella* F.)

วิธีการดำเนินการทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยวิธีการผสมลงในอาหารให้หนอนกิน (feeding method) มีขั้นตอนดังนี้

1. แยกตัวหนอนระยะที่ 1-2 ออกมาจากกล่องเลี้ยงเพื่อให้อุดอาหาร 2-3 ชั่วโมง
2. ผสม เชื้อ *B. thuringiensis* แต่ละสายพันธุ์ลงในอาหารเทียม โดยใช้ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 % โดยน้ำหนักของเชื้อ *B. thuringiensis* ต่อน้ำหนักของอาหาร ลงใน petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม.
3. นำตัวหนอนที่อุดอาหารใส่ลงในอาหาร petri dish ละ 10 ตัวทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ เลี้ยงในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 35 °C ความชื้น 65-70 %
4. บันทึกผลการตายของตัวหนอนใน 24 และ 48 ชั่วโมง
5. ทำการทดลองจนครบทั้งหมด 27 สายพันธุ์
6. คัดเลือกเชื้อที่มีความเป็นพิษต่อตัวหนอนไปทดสอบประสิทธิภาพในขั้นต่อไป

9. การศึกษาประสิทธิภาพของสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่มีต่อหนอนผีเสื้อกินใบทั้งสองสายพันธุ์

ก. การผสมเชื้อลงในอาหารเทียม (artificial diet) ให้ตัวหนอนกิน

1. แยกตัวหนอนระยะ 1-2 และ 3-4 ออกจากกล่องเลี้ยงมาอุดอาหาร 2-3 ชั่วโมง
2. นำเชื้อที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 8 มาผสมลงในอาหารเทียม ที่ความเข้มข้นต่างๆกันโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์น้ำหนักของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ต่อน้ำหนักของอาหาร ใส่ใน petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 2 เซนติเมตร
3. นำตัวหนอนจากข้อ 1 ใส่ลงใน petri dish ทำการทดลองทั้งหมด 6 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว
4. บันทึกผลการทดลองทุกๆ 24 ชั่วโมง จนถึงตัวเต็มวัย

ข. การผสมเชื้อลงในรวมรังผึ้งให้หนอนกิน

ตัดแผ่นรวงรังขนาด 2 x 2 นิ้ว นำมาจุ่มลงในสารละลายเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ที่มีความเข้มข้น 0.1, 1.0, 5.0, และ 10 g/l เป็นเวลา 1-3 วินาที แล้วนำมาผึ้งให้แห้งจากนั้น ทำการทดลองตามข้อ ก.

10. การทดสอบความเป็นพิษของสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ต่อตัวหนอนของมิ่งโพรง

Apis cerana

1. นำเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ของแต่ละสายพันธุ์มาผสมลงในรอยัลเจลลี่ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใส่ใน petri dish
2. ย้ายตัวหนอนอายุ 3 วันใส่ลงในรอยัลเจลลี่
3. ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว
4. บันทึกผลการทดลองการตายของหนอนผึ้ง 24, 48, และ 72 ชั่วโมง

11. การวิเคราะห์ผล

จากเปอร์เซ็นต์การตายของกลุ่มทดลองนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริงโดยใช้สูตร Abbott 's formula (Finney,1971) ซึ่งมีสูตรคือ

$$Pr = \frac{Po - Pc}{100 - Pc} \times 100$$

โดยกำหนดให้ Pr = % การตาย ที่แท้จริง

Po = % การตายของกลุ่มทดลอง

Pc = % การตายของกลุ่มควบคุม

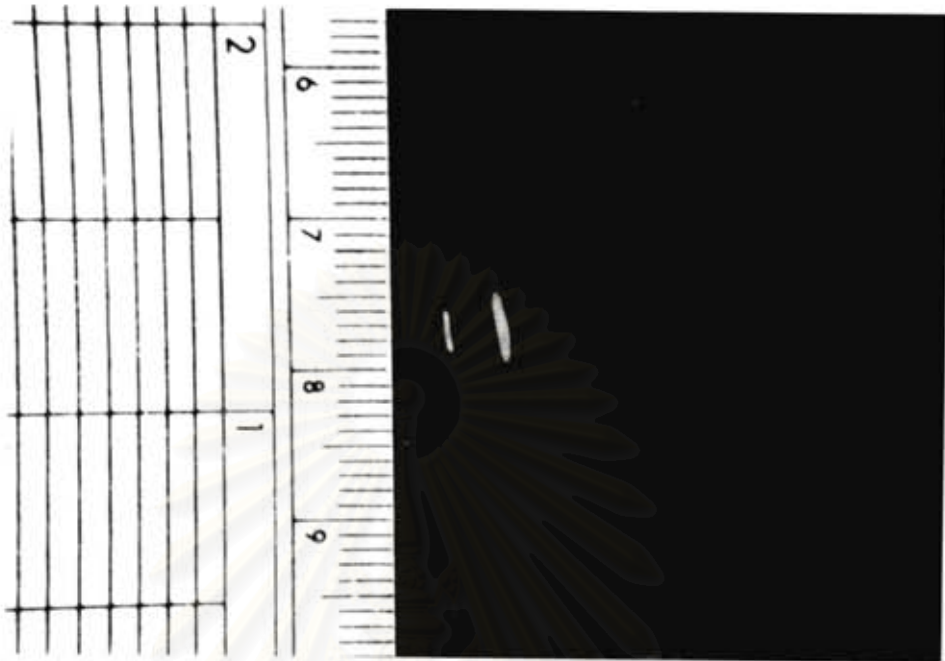
ใช้สูตรนี้เมื่อเปอร์เซ็นต์การตายในกลุ่มควบคุมน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ถ้าสูงกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ จะต้องทำการทดลองใหม่ จากนั้นเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย และเปอร์เซ็นต์อัตราการตายจริง และใช้วิเคราะห์ข้อมูลทางชีววิทยาเรียกว่า วิเคราะห์วิธีแปรทบิต (Probit analysis) ของ Finney (1971) คำนวณหาค่า LC_{50} เปรียบเทียบแต่ละสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* และระยะของหนอนผึ้งเลือกกินไขผึ้งขนาดเล็กและหนอนผึ้งเลือกกินไขผึ้งขนาดใหญ่

11. การวิเคราะห์ข้อมูล

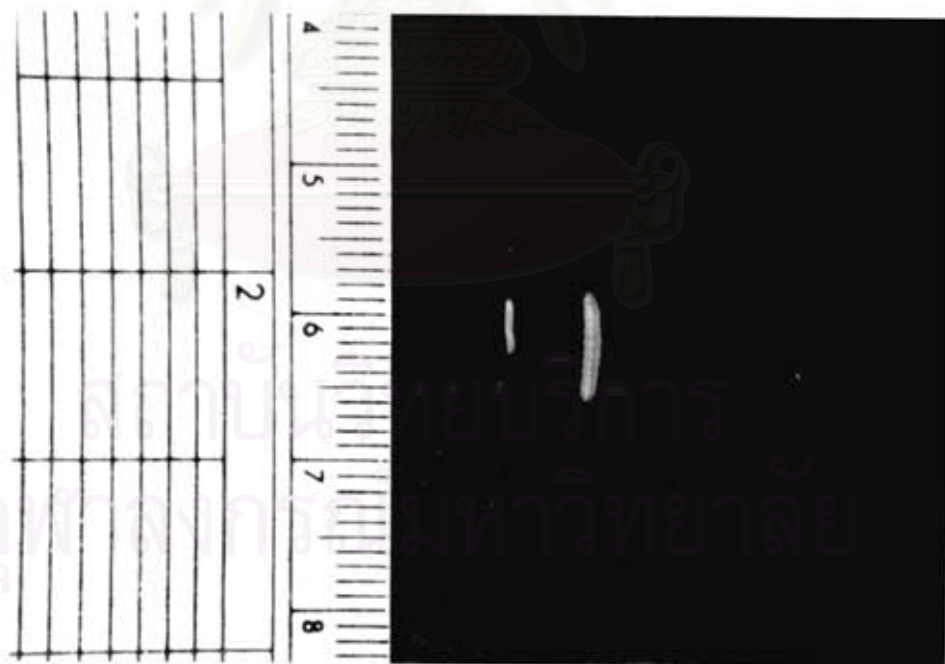
การหาค่า LC_{50} ใช้คอมพิวเตอร์โดยโปรแกรมวิเคราะห์โปรบิทของ Finney (1971) และข้อมูลที่ได้จากการทดลอง นำไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Analysis of variance เพื่อหา F value และ Duncan's new multiple range test (DMRT) สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล ณ. ระดับความเชื่อมั่น 95 %



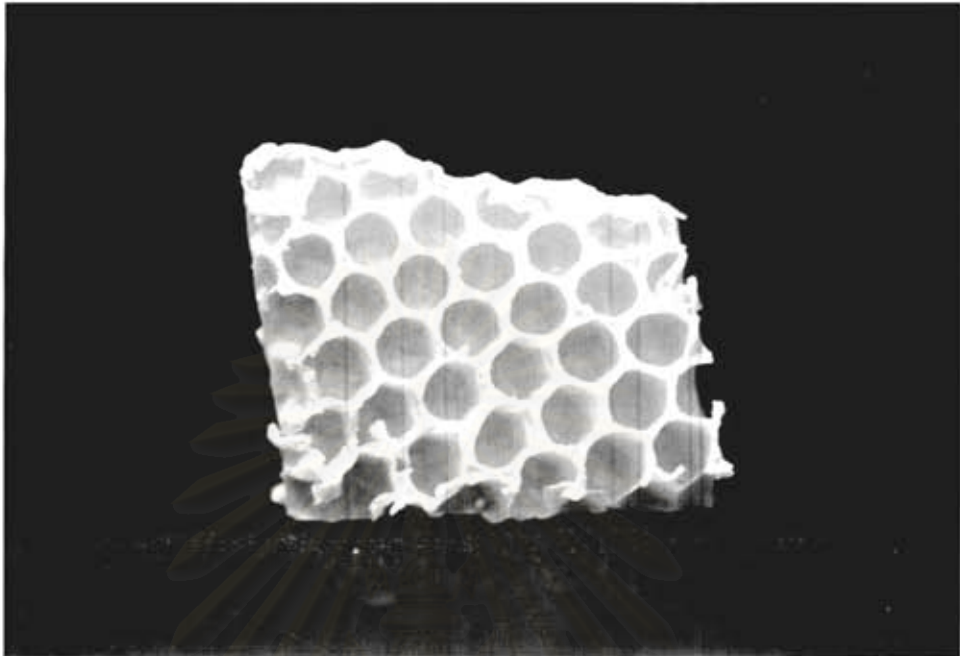
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพ 3.1 หนอนผีเสื้อกินไข่ม้วนขนาดเล็ก *Achroia grisella* F. ระยะ 1-2 และ 3-4



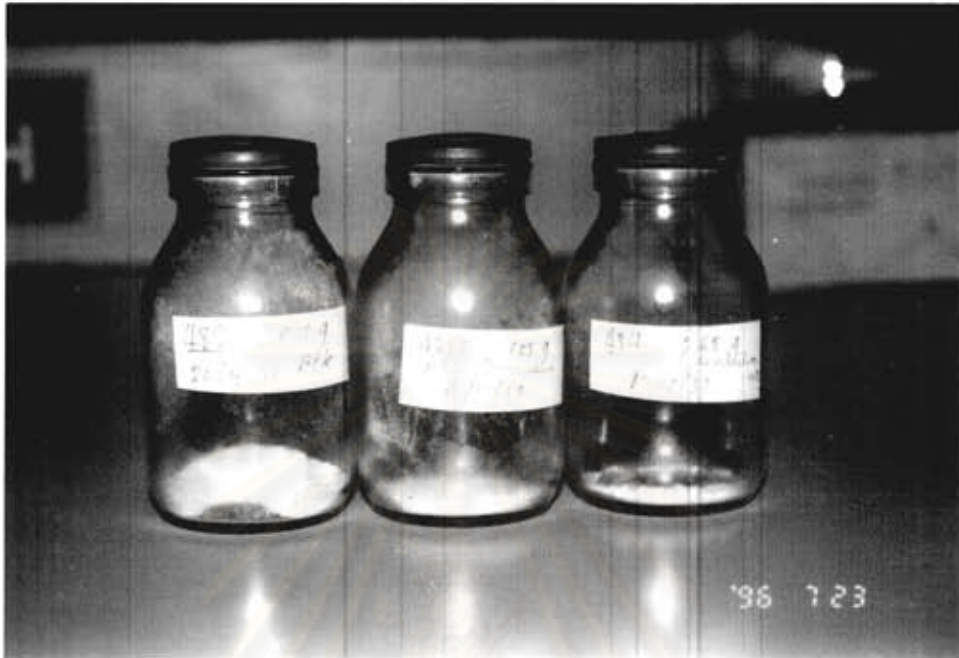
ภาพ 3.2 หนอนผีเสื้อกินไข่ม้วนขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* L. ระยะ 1-2 และ 3-4



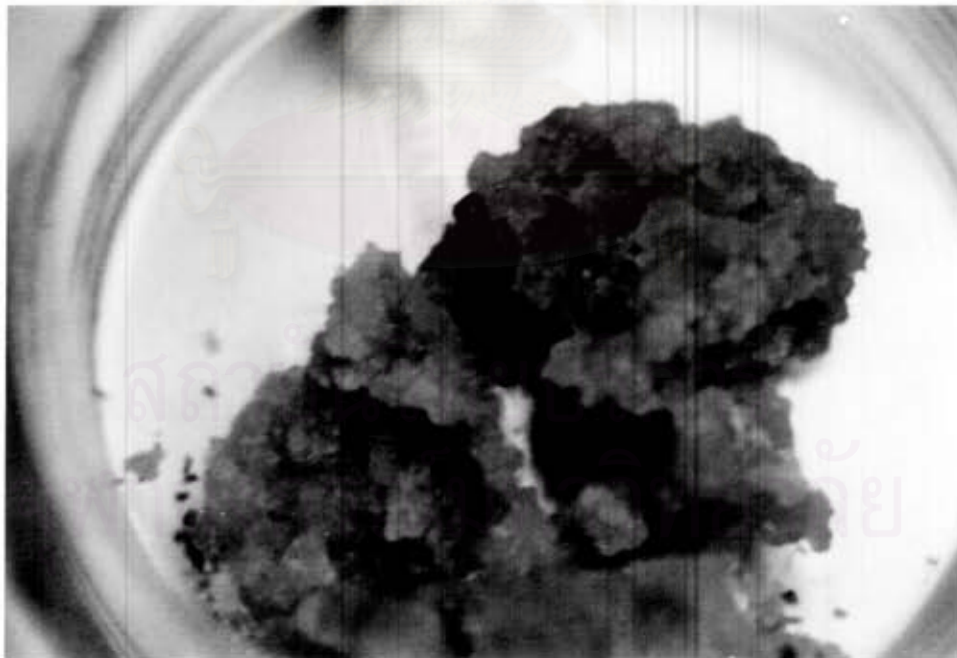
ภาพที่ 3.3 รวงรังผึ้งที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 3.4 อาหารสำหรับใช้ในการทดลอง



ภาพ 3.5 ลักษณะแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ใช้ในการทดลอง



ภาพ 3.6 ลักษณะการตายของหนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งขนาดเล็กที่กิน *Bacillus thuringiensis entomocidus*