บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การศึกษา Bt isolate ที่พบในดินในจังหวัดเชียงใหม่

3.1.1 การเก็บตัวอย่างดินและการแยกเชื้อออกจากตัวอย่างดิน

มี 2 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเก็บตัวอย่างดิน

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

ขั้นตอนที่ 2 การแยกเชื้อออกจากตัวอย่างดิน

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียออกจากเชื้ออื่นที่ปะปนอยู่ในดิน โดยนำตัวอย่างดินจำนวน 1 กรัม ผสมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร ภายในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (sterile distilled water) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง mixer นาน 5 นาที เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์กระจายตัวและแยกชั้นออกจากดิน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เพื่อให้ดินตกตะกอน แล้วเทน้ำใสที่อยู่ส่วนบนใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก็จะได้สารละลายดิน

นำสารละลายดินมาเจือจางลง 10 เท่า (serial dilution) ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 9:1 โดยใช้น้ำกลั่นจำนวน 1.8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายดินจำนวน 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นจนได้สารละลายดินที่ความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ สำหรับทำการ spread plate เพื่อแยกเชื้อต่อไป

เตรียมอาหารวุ้นสำหรับการ spread plate โดยใช้ nutrient agar อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 1,000 มิลลิลิตร นำมาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แล้วเทใส่ในจานแก้ว (petri dish) อาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บไว้ใน incubator ปล่อยให้ผิวหน้าอาหารแห้งจึงจะนำไปใช้

จากนั้นนำสารละลายดินที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} มาทำการ spread plate โดยหยดสารละลายดินจำนวน 100 ไมโครลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ เกลี่ยด้วยแท่งแก้ว และนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเลือกเก็บกลุ่มเชื้อ (colony) ที่มีลักษณะขาวขุ่น ขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีด้านไม่เป็นมันวาว และมีขอบไม่เรียบ ซึ่งเป็นลักษณะของโคโลนีเชื้อ Bt บันทึกผลจำนวนเชื้อ Bt isolate ที่ได้ในแต่ละตัวอย่างดินที่เก็บมา จากนั้นนำกลุ่มเชื้อที่แน่ใจว่าเป็นเชื้อ Bt เขี่ยลงในหลอดอาหารเอียง (slant agar) และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนกระทู้หอมต่อไป

3.1.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ Bt isolate

นำเชื้อ Bt ที่แยกออกจากตัวอย่างดินมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ด้วยวิธี streak plate นำโคโลนีเดี่ยว (single colony) ที่ได้มาใส่สไลด์ด้วยวิธีการ wet mount technique เพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อด้วยการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า ซึ่งถ้าเป็นเชื้อ Bt จะพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นท่อนตรง มีผลึกโปรตีน และสปอร์อยู่ภายในเซลล์ ทำการบันทึกลักษณะรูปร่างของผลึกโปรตีนของเชื้อ Bt แต่ละ isolate จากนั้นเก็บเชื้อโคโลนีเดี่ยวอีกส่วนหนึ่งไปเลี้ยงต่อด้วยอาหารเหลว (nutrient broth) สำหรับใช้เป็น stock culture ซึ่งจะเก็บไว้ในกลีเซอลีนความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เชื้อ Bt จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับกลีเซอลีนความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาดเล็กที่มีฝาปิด และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* (Hübner)) ในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพความเป็นพิษของ Bt isolate ต่าง ๆ ที่แยกออกมาได้จากดินกับแมลงอาศัย โดยทำการทดสอบด้วยวิธี diet plug method กับหนอนกระทู้หอมวัย 2 ที่เลี้ยงขยายด้วยอาหารเทียมเลี้ยงแมลง ซึ่งมีวิธีการเลี้ยงขยายปริมาณดังนี้

การเลี้ยงขยายปริมาณหนอนกระทู้หอมเพื่อใช้ในการทดสอบ

ทำการเก็บหนอนกระทู้หอมที่อยู่ตามธรรมชาติในแปลงปลูกพืช มาเลี้ยงด้วยอาหารเทียมเลี้ยงแมลงโดยต้องเลี้ยงหนอนที่เก็บมาไว้ในห้องกักกันโรคก่อนเพื่อตรวจดูว่ามีโรคปะปนติดมากับหนอนหรือไม่ โดยเลี้ยงไว้อย่างน้อย 2 วงจรชีวิต เพื่อให้มั่นใจว่าเมื่อนำไปเพิ่มปริมาณจะไม่เกิดปัญหาโรคระบาด

เมื่อเลี้ยงหนอนที่ผ่านการกักกันโรคแล้วจนเจริญเข้าดักแด้ ทำการคัดเลือกดักแด้เพศผู้และเพศเมียที่มีสภาพสมบูรณ์ เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ โดยนำดักแด้ใส่ในโป๊ะตะเกียงแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร จำนวน 10 คู่ต่อโป๊ะ ปิดด้านบนโป๊ะด้วยผ้าขาวบางและห้อยแผ่นกระดาษทิชชูไว้ด้านในเพื่อใช้เป็นที่วางไข่ของแม่ผีเสื้อและใส่สำลีชุบน้ำผสมน้ำผึ้งสำหรับเป็นอาหารของผีเสื้อ ทำการเก็บแผ่นไข่ทุก 2 วันพร้อมทั้งเปลี่ยนแผ่นกระดาษใหม่ใส่ลงไปด้วย

ไข่ของผีเสื้อหนอนกระทู้หอมที่เก็บได้ต้องมีการป้องกันการเกิดระบาดของโรคไวรัสและโปรโตซัวที่สามารถถ่ายทอดจากแม่ผีเสื้อซึ่งติดมากับเปลือกไข่ โดยแช่ไข่ผีเสื้อในสารละลาย sodium hypochlorite 0.05 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที หรือในสารละลาย formalin 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที จากนั้นนำไปล้างน้ำสะอาด 1-2 ครั้ง แล้วนำไปใส่ในภาชนะที่มีน้ำไหลผ่านเบา ๆ 5-10 นาที จากนั้นนำมาผึ่งให้แห้งแล้วนำมาใส่ภาชนะเลี้ยงที่มีความชื้นสูง รอการฟักของไข่ต่อไป

นำไข่ผีเสื้อที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วมาใส่ในถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์ ซึ่งมีอาหารเทียมเลี้ยงแมลงอยู่ภายใน ถ้วยละประมาณ 100 ฟอง เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยไว้ให้ไข่ฟักเป็นตัวหนอนและกินอาหารที่อยู่ในถ้วย จนกระทั่งหนอนเจริญจนถึงวัย 3 จะทำการคัดเลือกหนอนที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง ลำตัวมีสีสด มีการเจริญเติบโตสม่ำเสมอเพื่อเป็นพ่อและแม่พันธุ์ โดยคัดแยกใส่ในถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์ ที่มีอาหารเทียม ถ้วยละ 1 ตัว เลี้ยงจนหนอนเข้าดักแด้ จึงนำมาคัดแยกเพศเพื่อใช้ทำเป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป ทำการเลี้ยงจนได้หนอนรุ่นที่ F2 จึงนำหนอนวัย 2 มาใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้น (Preliminary screening test)

เนื่องจาก เชื้อ Bt ที่แยกได้ออกมาจากดินมีเป็นจำนวนมาก ดังนั้นเพื่อความสะดวกและรวดเร็วต่อการตรวจสอบความเป็นพิษของเชื้อ จึง ต้องใช้วิธีการทดสอบประสิทธิภาพในเบื้องต้นเพื่อทำการคัดเลือกเชื้อ Bt isolate ที่สามารถฆ่าหนอนได้จริงออกมาก่อนโดยทำการทดสอบด้วยวิธีการ diet plug method ซึ่งมีวิธีการดังนี้

เลี้ยงเชื้อ Bt isolate บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้ว ทำการผสมเชื้อ Bt isolate ปริมาณ 4 loopfull ต่อน้ำกลั่นน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ทำการเจาะอาหารเทียมเลี้ยงแมลงด้วยที่เจาะจุกคอร์กเบอร์ 1 ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 มิลลิเมตร สูง 3 มิลลิเมตร วางบนจานอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นหยดสารละลายเชื้อ Bt ที่เตรียมไว้ลงบนก้อนอาหารเทียม ก้อนละ 5 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง (ภาพ 5 และ 6) คัดเลือกหนอนกระทู้หอมวัย 2 ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน และปล่อยให้อดอาหารประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อเตรียมไว้สำหรับทำการทดสอบ หลังจากนั้นนำอาหารเทียมที่หยดเชื้อแล้วใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 3 มิลลิลิตร (ภาพ 7) พร้อมทั้งเขี่ยหนอนกระทู้หอมลงในหลอด หลอดละ 1 ตัว

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นที่มีต่อหนอนกระทู้หอมวัย 2 จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว ซึ่งในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้คัดเลือก Bt isolate ที่ทำให้หนอนตาย 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปมาทำการทดสอบซ้ำในครั้งที่ 2 และ ครั้งที่ 3 ด้วยวิธีการเดิม แต่ใช้เชื้อ Bt isolate ในการทดสอบ 1 loopfull ต่อน้ำกลั่นน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ในแต่ละ isolate จากนั้นจึงคัดเลือก Bt isolate ที่ทำให้หนอนตาย 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปเพื่อนำไปศึกษา insect bioassay ต่อไป

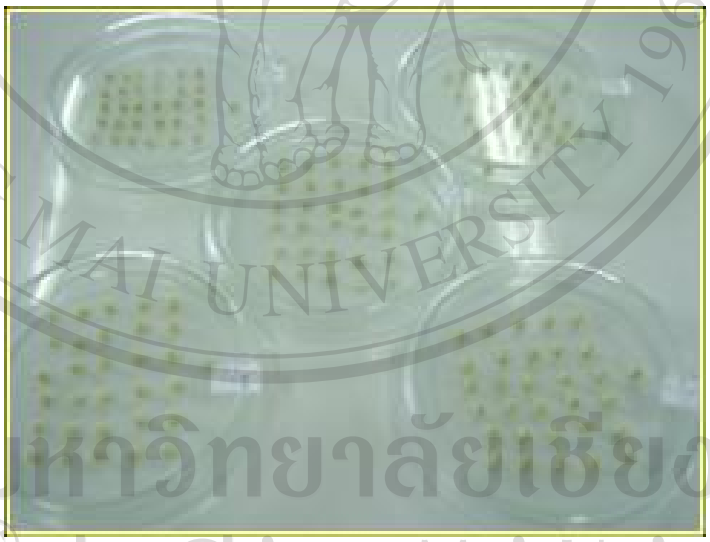
3.2.2 Insect bioassay

ทำการทดสอบด้วยวิธี diet plug method เช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้น โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 10 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีปรับความเข้มข้นของเชื้อที่ 1 x 10^7 cfu/ml โดยใช้ Bt subsp. *kurstaki* HD-1 และ Bt subsp. *aizawai* (Xentari) เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ และให้น้ำเปล่าเป็นกรรมวิธีควบคุม ซึ่งแต่ละกรรมวิธีทำ 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้หนอนกระทู้หอมวัย 2 ซ้ำละ 20 ตัว

บันทึกผลการตายของหนอนที่ 3, 5 และ 7 วัน ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IRRISTAT และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 5 การหยดเชื้อ Bt ลงในก้อนอาหารเทียม



ภาพ 6 ก้อนอาหารเทียมที่หยดเชื้อแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 7 หลอดพลาสติกขนาด 3 มิลลิลิตรและก้อนอาหารเทียม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การศึกษาผลึกโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

นำเชื้อ Bt isolate ที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี insect bioassay กับหนอนกระทู้หอม แล้ว มาเลี้ยงขยายในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการสกัดโปรตีนเพื่อศึกษาขนาดของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) มี 2 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดโปรตีนและการแยกขนาดของโปรตีน

นำเชื้อ Bt ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่ใน microtube แล้วนำไปเข้าเครื่อง centrifuge ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อทำให้โปรตีนหลุดออกมาจากเซลล์ จากนั้นดูดน้ำส่วนบนทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 400 ไมโครลิตร และนำไปเข้าเครื่อง centrifuge อีกครั้งเพื่อทำการล้างโปรตีนที่ได้ให้สะอาด

จากนั้นใช้ pipett ดูดน้ำส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่โปรตีนที่ตกตะกอนในก้นหลอด แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 20 ไมโครลิตร ใช้ปลาย tip กวนโปรตีนในหลอดให้ละลาย หลังจากนั้นเติม 4X loading buffer จำนวน 20 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างโปรตีน แล้วผสมให้เข้ากันและนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที จากนั้นนำเข้าเครื่อง centrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

นำตัวอย่างโปรตีนที่ผสมกับ 4X loading buffer แล้ว load ลงใน polyacrylamide gel ที่อยู่ในชุด electrophorsis ที่เตรียมไว้แล้วลงในช่อง (well) ช่องละ 10 ไมโครลิตร โดยให้ load standard marker 3 ไมโครลิตรลงในช่องแรก เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล เดินเครื่อง electrophorsis โดยใช้กระไฟฟ้าคงที่ที่ 100 volt จนกระทั่งเห็นโปรตีนเคลื่อนที่มาจนถึงปลายล่างของเจลจึงปิดเครื่อง

ขั้นตอนที่ 2 การย้อมสีโปรตีนในเจล

เตรียม staining solution โดยใช้ 0.1% coomassie brilliant blue R-250 ผสมลงใน 40% methanol และ 10% acetic acid เพื่อใช้ย้อมแผ่นเจลที่ได้ แช่ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที (เขย่าแผ่นเจลที่แช่สีย้อมไว้ด้วย shaker ความเร็ว 50 รอบต่อนาที) จากนั้นทำการ destain สีที่ย้อมเจลด้วยสารผสมของ 10% methanol และ 10% acetic acid เปลี่ยนสารละลายที่ใช้ destain หลาย ๆ ครั้ง จนเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนอย่างชัดเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำเจลที่ผ่านการ destain แล้วมาทำให้แห้ง โดยมาแช่ใน methanol 10% ประมาณ 10-15 นาที เพื่อให้เจลไม่เปราะขาดง่าย แล้วจึงนำไปทำให้เจลแห้งบนกระดาษแก้วเซลโลเฟน ทำการบันทึกภาพถ่ายผลแถบโปรตีนที่ได้จากเจลที่แห้งแล้ว จากนั้นจึงนำภาพถ่ายมาอ่านค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยโปรแกรม Gene Tools version 3.06 ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved