ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

นางสาววารุณี ตันติธนากรกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FACTORS AFFECTING THE PRODUCTION OF INSECTICIDAL SUBTANCES BY *Streptomyces* spp. STRAINS 442, 449 AND O145702

Miss Warunee Tantithagorngul

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702
โดย	นางสาววารุณี ตันติธนากรกุล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

รองคณบดีฝ่ายบริหารรักษาการแทน
.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลวรรณ พิมพ์พันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์)

.....กรรมการ
(ดร. ศรินทิพ สุกใส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วารุณี ตันติธนากรกุล : ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 (FACTORS AFFECTING THE PRODUCTION OF INSECTICIDAL SUBTANCES BY *Streptomyces* spp. STRAINS 442, 449 AND O145702) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. วาสนา โตเลี้ยง, 121 หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจาก *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ซึ่งแยกได้จากดินในประเทศไทย และการทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงทำโดยสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยด้วยเอทิลอะซิเทต แล้วทดสอบการฆ่าไรทะเลโดยบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการแปรชนิดของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน พบว่าในสายพันธุ์ 442 แป้งมันสำปะหลัง 1.5 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด เมื่อใช้ร่วมกับแหล่งอินทรีย์หรือแหล่งอนินทรีย์ในโตรเจนที่เหมาะสมคือ สารสกัดจากยีสต์ หรือไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.025 และ 0.05 %(w/v) ให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงถึง 91.16 และ 70.42 % ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 25 ppm ขณะที่สายพันธุ์ 449 พบว่าแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด เมื่อใช้ร่วมกับแหล่งอินทรีย์หรือแหล่งอนินทรีย์ในโตรเจนที่เหมาะสมคือ สารสกัดจากยีสต์ หรือไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.075 % (w/v) ให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงถึง 98.58 และ 93.80 % ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 5 ppm ส่วนสายพันธุ์ O145702 พบว่าแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลส มีค่า DE เท่ากับ 38 % เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.5 % (w/v) และใช้ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือผสมระหว่าง สารสกัดจากยีสต์ และโพแทสเซียมไนเตรท 0.2 และ 0.38 % (w/v) ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.0744 % (w/v) ให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงถึง 91.5 % เมื่อใช้ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm นอกจากนี้ยังได้หาความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสารสกัดหยาบที่ทำให้ ไรทะเลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนเริ่มต้น (LD_{50}) จากทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ให้ค่า LD_{50} ที่ 10, 3.5 และ 12.5 ppm ตามลำดับ และจากการทดลองแยกสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสารสกัดหยาบโดย Preparative TLC พบว่าสามารถแยกสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสารสกัดหยาบได้สารผสม 3 ชนิด จากสายพันธุ์ 442 และ 4 ชนิด จากสายพันธุ์ 449 และ O145702 ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดที่แยกได้ในแต่ละชนิดไปทดสอบกับไรทะเล พบว่าสายพันธุ์ 442 สารผสมที่ 1 ซึ่งมีค่า R_f 0.18, สายพันธุ์ 449 สารผสมที่ 4 ซึ่งมีค่า R_f 0.86 และสายพันธุ์ O145702 สารผสมที่ 3 ซึ่งมีค่า R_f 0.59 ให้ประสิทธิภาพที่ดีในการฆ่าไรทะเล และเมื่อนำแต่ละชนิดที่มีฤทธิ์ฆ่าไรทะเลจากทั้ง 3 สายพันธุ์มาวิเคราะห์โดย analytical TLC และ HPLC เทียบกับสารมาตรฐาน avermectins พบว่าสารดังกล่าวให้ค่า R_f จาก TLC และค่า retention time จาก HPLC ที่ต่างจาก avermectins ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าทั้ง 3 สายพันธุ์สร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงชนิดใหม่

สาขาวิชา .....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....วารุณี ตันติธนากรกุล.....

ปีการศึกษา .....2551..... ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....วาสนา โตเลี้ยง.....

4872459123 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: BIOINSECTICIDE/ PRODUCTION/ *Streptomyces*

WARUNEE TANTITHANAGORNGUL : FACTORS AFFECTING THE PRODUCTION OF INSECTICIDAL SUBTANCES BY *Streptomyces* spp. STRAINS 442, 449 AND O145702 THESIS PRINCIPAL ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D., THESIS COADVISOR : VASANA TOLIENG, 121 pp.

Optimal conditions for the production of insecticidal substances by *Streptomyces* spp. 442, 449 and O145702 isolated from Thai soil were investigated. Insecticidal activity was determined from the culture extracted with ethyl acetate by testing against brine shrimp for 24 h. For 442, cassava starch at 1.5% (w/v) and yeast extract or $(NH_4)_2HPO_4$ at the concentration equivalent to 0.025 and 0.05 % nitrogen (w/v), respectively gave maximum insecticidal activity of 91.16 and 70.42%, respectively with 25 ppm of the crude extract. For 449, cassava starch at 1.5% (w/v) and yeast extract or $(NH_4)_2HPO_4$ at the concentration equivalent to 0.075 % nitrogen (w/v) gave maximum insecticidal activity of 98.58 and 93.80%, respectively with 5 ppm of the crude extract. For O145702, 0.5% (w/v) of partial hydrolyzed cassava starch at 38%DE and the mixture of 0.2% yeast extract and 0.38% KNO_3 having total N-content of 0.074 % (w/v) gave maximum insecticidal activity of 91.5% with 50 ppm of the crude extract. LD_{50} values were determined from the crude extracts to be 10, 3.5 and 12.5 ppm for 442, 449 and O145702, respectively. The components in the crude extracts were subjected to separation by preparative TLC and found 3, 4 and 4 mixtures for strains 442, 449 and O145702, respectively. Analysis against brine shrimp indicated that the first mixture with R_f value of 0.18 from 442, the fourth mixture with R_f value of 0.86 from 449 and the third mixture with R_f value of 0.59 from O145702 possessed insecticidal activities. They were then analyzed by analytical TLC and HPLC comparing to avermectins, commercial insecticidal compounds, and found that all separated compounds showed different TLC-R_f values and HPLC-retention times from those of avermectins indicating possible novel insecticidal compounds might be produced from these strains.

Field of study.....Biotechnology.....Student's signature.....Warunee Tan.....

Academic year .....2008.....Principal Advisor's signature.....Pairoh Pinp.....

Co-advisor's signature.....Vasana Tolieng.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และอาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์ และ ดร. ศรินทิพ สุกใส ที่กรุณารับเป็นประธาน และคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ความรู้ คำปรึกษา และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนในงานวิจัยนี้ และขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณพี่อัจฉรา สุจิตวานิช พี่ปาริสรา จันทร์ทอง และพี่จิราภรณ์ พิลึก ที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกด้วยดีตลอดการวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่ใช้ชีวิตร่วมกันในแผนก ที่มีส่วนช่วยให้มีกำลังใจ และกำลังกาย ในการทำงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่สุภัค และคุณพ่ออาจหาญ ตันติธนากรกุล ที่เป็นกำลังใจ และสนับสนุนมาโดยตลอด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฏ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ต

บทที่

1. บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 4

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 4

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

2.1 พัฒนาการของสารฆ่าแมลงและวิวัฒนาการการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย..... 5

2.2 การจำแนกกลุ่มของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง..... 9

2.3 *Streptomyces* spp..... 19

2.4 สารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites)..... 20

2.5 การนำมาใช้ประโยชน์..... 21

2.6 สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ผลิตได้จาก *Streptomyces* spp..... 23

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ..... 24

3. วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย..... 26

3.1 วัสดุอุปกรณ์..... 26

3.2 เคมีภัณฑ์..... 27

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง..... 29

3.3.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงเบื้องต้นของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ในอาหารวุ้นแข็ง และการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อทดสอบ..... 29

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3.3.2 การเลี้ยงและการทดสอบสารออกฤทธิ์ต่อไรทะเล (Brine shrimp) 29
3.3.3 การเลี้ยง *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702..... 30
3.3.4 การสกัดสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง..... 30
3.3.5 การศึกษาผลของกลูโคสต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของสายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ในอาหารเหลว..... 31
3.3.6 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง โดย *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702……..... 32
3.3.7 ปริมาณอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการสร้างสาร ออกฤทธิ์ฆ่า แมลงโดย *Streptomyces* spp……..... 33
3.3.8 อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ..... 35
3.3.9 การหาความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ทำให้ไรทะเลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ของ จำนวนเริ่มต้น (LD_{50})……..... 35
3.3.10 การแยกสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสารสกัดหยาบโดยวิธีโครมาโทกราฟี (chromatography) 35
4. ผลการทดลอง..... 38
4.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารวุ้นแข็ง…….. 38
4.2 การตรวจสอบแหล่งสะสมสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ในอาหารเหลว……. 39
4.3 ผลของความเข้มข้นกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง และการเจริญของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702……. 41
4.4 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702……. 44
4.5 ผลของอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702…….. 59
4.6 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ…… 75
4.7 ผลของความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ทำให้ ไรทะเลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนเริ่มต้น (LD_{50}) 80
4.8 การแยกสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสารสกัดหยาบโดยวิธีโครมาโทกราฟี 81

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 93
รายการอ้างอิง..... 97
ภาคผนวก……. 107
ภาคผนวก ก…….. 108
ภาคผนวก ข…….. 109
ภาคผนวก ค…….. 111
ภาคผนวก ง…….. 118
ภาคผนวก จ……. 120
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์…… 121

.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ประวัติการใช้สารฆ่าแมลงอินทรีย์สังเคราะห์กลุ่มหรือชนิดต่างๆ…….	7
2.2	ปริมาณการนำเข้าสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตร ปี 2525-2544……..	8
2.3	ตัวอย่างสารจุลินทรีย์ฆ่าแมลงจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งมีการผลิตจำหน่าย.....	15
2.4	ตัวอย่างสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิชนิดต่างๆ ที่ผลิตได้จาก *Streptomyces* spp.	21
3.1	Gradient Elution.....	37
4.1	ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อ ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเล ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 25 ppm ของเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB เป็นเวลา 3 วัน.....	44
4.2	ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการเจริญของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB เป็นเวลา 3 วัน..……	45
4.3	ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดต่อการเจริญของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB เป็นเวลา 3 วัน.....	49
4.4	ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดต่อการเจริญของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 449 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB เป็นเวลา 3 วัน.....	52
4.5	ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ถูกย่อยด้วยอะไมเลสมีค่า DE 38% ต่อการเจริญของ *Streptomyces* สายพันธุ์ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB เป็นเวลา 3 วัน.....	54
4.6	ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.074 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702.....	60
4.7	ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.074 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702.....	61

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ หน้า

4.8 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ ต่อการเจริญของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442 และ 449..... 63

4.9 ผลของความเข้มข้นของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ต่อการเจริญของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442 และ 449..... 65

4.10 ผลของสัดส่วนปริมาณระหว่างสารสกัดจากยีสต์กับโพแทสเซียมไนเตรต หรือกับไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน เท่ากับ 0.074 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการเจริญของเชื้อ O145702 และต่อเปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลที่ 24 ชั่วโมง (โดยใช้ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 25 ppm) เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน..... 66

4.11 ผลการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. 442 ที่แยกโดย Preparative Thin Layer Chromatography เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ..... 82

4.12 ผลการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. 449 ที่แยกโดย Preparative Thin Layer Chromatography เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ..... 82

4.13 ผลการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของสารสกัดจาก *Streptomyces* sp.O145702 ที่แยกโดย Preparative Thin Layer Chromatography เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ.. 83

5.1 ภาวะเหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702..... 93

ง.2 สัดส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณเทียบเท่ากับไนโตรเจนรวม 0.074%..... 119

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้าง avermectins	2
2.1	โครงสร้างไพรีทริน.....	11
2.2	วงชีวิตของ *Streptomyces* spp.....	20
4.1	เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 บนอาหารวุ้นแข็งสูตรดัดแปลงจาก LB ที่เวลาต่างๆ.....	38
4.2	เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล บ่ม 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบเข้มข้น 50 ppm จากเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน.....	40
4.3	เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล บ่ม 24 ชั่วโมงเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบเข้มข้น 50 ppm จาก *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน.....	41
4.4	ผลของความเข้มข้นกลูโคสต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ทดสอบที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	42
4.5	ผลของความเข้มข้นกลูโคสต่อการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702.....	43
4.6	ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อประสิทธิภาพในการสร้างสารฆ่าแมลง ของเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB เป็นเวลา 3 วัน (ใช้สารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง).....	46
4.7	ผลของความเข้มข้นของ (ก) แป้งมันสำปะหลัง และ (ข) แป้งข้าวโพด ต่อ การสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลโดยสายพันธุ์ 442 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน (ใช้สารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง).....	48

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ หน้า

4.8 ผลของความเข้มข้นของ (ก) แป้งมันสำปะหลัง และ (ข) แป้งข้าวโพด ต่อ การสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลโดยสายพันธุ์ 449 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน (ใช้สารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)..... 51

4.9 ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสมีค่า DE 38% ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลโดยสายพันธุ์ O145702 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน (ใช้ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)..... 53

4.10 ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล ณ ชั่วโมงที่ 24 จากสารสกัดหยาบที่ 50 ppm โดย *Streptomyces* sp. 442 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน..... 55

4.11 ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่และการเจริญของสายพันธุ์ 442 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 7 วัน..... 55

4.12 ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล ณ ชั่วโมงที่ 3 จากสารสกัดหยาบที่ 50 ppm โดย *Streptomyces* sp. 449 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน..... 56

4.13 ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่และการเจริญของสายพันธุ์ 449 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 7 วัน..... 57

4.14 ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล ณ ชั่วโมงที่ 24 จากสารสกัดหยาบที่ 50 ppm โดย *Streptomyces* sp. O145702 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่เวลา 5 นาที มีค่า DE เท่ากับ 38% ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน..... 58

4.15 ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่และการเจริญของสายพันธุ์ O145702 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่เวลา 5 นาที มีค่า DE เท่ากับ 38% ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 7 วัน..... 58

รูปที่ หน้า

4.16 ผลของความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของสายพันธุ์ 442 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (ใช้สารสกัดหยาบ 25 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)..... 62

4.17 ผลของความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของสายพันธุ์ 449 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (ใช้สารสกัดหยาบ 5 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)..... 62

4.18 ผลของความเข้มข้น $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง ของสายพันธุ์ 442 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (ใช้สารสกัดหยาบ 25 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)..... 64

4.19 ผลของความเข้มข้น $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง ของสายพันธุ์ 449 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (ใช้สารสกัดหยาบ 5 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)..... 64

4.20 ผลของระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442 เมื่อเลี้ยงด้วยแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.025 % (ใช้สารสกัดหยาบ 25 ppm บ่มเป็นเวลาที่ 24 ชั่วโมง)..... 67

4.21 ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสายพันธุ์ 442 กับความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นในรูปไนโตรเจน 0.025 %..... 68

4.22 ผลของระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442 เมื่อเลี้ยงด้วยแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.05 % (ใช้สารสกัดหยาบ 25 ppm บ่มเป็นเวลาที่ 24 ชั่วโมง)..... 69

4.23 ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสายพันธุ์ 442 กับความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นในรูปไนโตรเจน 0.05 %..... 69

4.24 ผลของระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 449 เมื่อเลี้ยงด้วยแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.075 % (ใช้สารสกัดหยาบ 5 ppm บ่มเป็นเวลาที่ 24 ชั่วโมง)..... 70

รูปที่ หน้า

4.25 ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสายพันธุ์ 449 กับความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นในรูปไนโตรเจน 0.075 %..... 71

4.26 ผลของระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 449 เมื่อเลี้ยงด้วยแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.075 % (ใช้สารสกัดหยาบ 5 ppm บ่มเป็นเวลาที่ 24 ชั่วโมง)..... 72

4.27 ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสายพันธุ์ 449 กับความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นในรูปไนโตรเจน 0.075 %..... 72

4.28 ผลของระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ O145702 เมื่อเลี้ยงด้วยแป้งมันสำปะหลังย่อยด้วยอะไมเลส ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างสารสกัดจากยีสต์กับ KNO_3 ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.074 % (ใช้สารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลาที่ 24 ชั่วโมง)..... 73

4.29 ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสายพันธุ์ O145702 กับความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหลือ เมื่อเลี้ยงด้วยแป้งมันสำปะหลังย่อยด้วยอะไมเลส ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างสารสกัดจากยีสต์กับ KNO_3 ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.074 %..... 74

4.30 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702..... 76

4.31 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442 เมื่อใช้ (ก) สารสกัดจากยีสต์ และ (ข) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน (ใช้สารสกัดหยาบเข้มข้น 25 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)..... 77

4.32 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 449 เมื่อใช้ (ก) สารสกัดจากยีสต์ และ (ข) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน (ใช้สารสกัดหยาบเข้มข้น 5 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)..... 78

รูปที่ หน้า

4.33 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ O145702 เมื่อใช้ไนโตรเจนผสมระหว่างสารสกัดจากยีสต์และโพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน (ใช้สารสกัดหยาบเข้มข้น 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)..... 79

4.34 ผลของความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ทำให้ไรทะเลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนเริ่มต้น (LD_{50})…….. 80

4.35 รูปจำลองการแยกสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* spp.สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702โดยใช้ Preparetive Thin Layer Chromatography……. 81

4.36 ค่า R_f ของสารฆ่าแมลงมาตรฐาน 1. avermectin 2. doramectin 3. ivermectin….. 83

4.37 ค่า R_f ของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงแต่ละแถบที่แยกได้จาก Preparative TLC จากสายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 เปรียบเทียบกับ avermectin (Avm = avermectin, C = สารสกัดหยาบ และ B1-B4 = แถบที่ 1-4) เมื่อวิเคราะห์โดย Analytical TLC โดยมีเอทิลอะซิเทต เป็น mobile phase…… 84

4.38 ค่า R_f ของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงแต่ละแถบที่แยกได้จาก Preparative TLC จากสายพันธุ์ 442 วิเคราะห์โดย Analytical TLC โดยมี mobile phase เป็น (ก) เอทิลอะซิเทต (ข) 10% เมทานอล : 90% เอทิลอะซิเทต (ค) 15% เมทานอล : 85% เอทิลอะซิเทต และ (ง) 20% เมทานอล: 80% เอทิลอะซิเทต เปรียบเทียบกับ avermectin (Avm = avermectin, C = สารสกัดหยาบ และ B1-B4 = แถบที่ 1-4)…… 86

4.39 ค่า R_f ของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงแต่ละแถบที่แยกได้จาก Preparative TLC จากสายพันธุ์ O145702 วิเคราะห์โดย Analytical TLC โดยมี mobile phase เป็น (ก) เอทิลอะซิเทต (ข) 10% เมทานอล : 90% เอทิลอะซิเทต (ค) 15% เมทานอล : 85% เอทิลอะซิเทต และ (ง) 20% เมทานอล: 80% เอทิลอะซิเทต เปรียบเทียบกับ avermectin (Avm = avermectin, C = สารสกัดหยาบ และ B1-B4 = แถบที่ 1-4)…… 87

4.40 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานของ (ก) avermectin, (ข) doramectin และ (ค) ivermectin..... 88

4.41 โครมาโทแกรมของของ (ก) สารสกัดหยาบ, (ข)- (ง) สารสกัดที่แยกได้จาก Preparative TLC แถบที่ 1-3 ตามลำดับ จากเชื้อ *Streptomyces* sp. 442……. 90

รูปที่ หน้า

4.42 โครมาโทแกรมของของ (ก) สารสกัดหยาบ, (ข)-(จ) สารสกัดที่แยกได้จาก Preparative TLC แถบที่ 1- 4 ตามลำดับ จากเชื้อ *Streptomyces* sp. 449……. 91

4.43 โครมาโทแกรมของของ (ก) สารสกัดหยาบ, (ข)-(จ) สารสกัดที่แยกได้จาก Preparative TLC แถบที่ 1- 4 ตามลำดับ จากเชื้อ *Streptomyces* sp. O145702….. 92

ข.1 แสดงค่า %DE ของแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลสที่เวลาต่างๆ…… 110

ค.1 กราฟมาตรฐานโปรตีน…… 112

ค.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส…….. 113

จ.1 ชุดกรองสปอร์ของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702…… 120

จ.2 อุปกรณ์การเพาะเลี้ยงไรทะเล (Brine shrimp)…….. 120

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	เปอร์เซ็นต์
w/v	=	น้ำหนักต่อปริมาตร
µl	=	ไมโครลิตร
nm	=	นาโนเมตร
mL	=	มิลลิลิตร
rpm	=	รอบต่อนาที
α	=	alpha
ppm	=	part per million
HPLC	=	high performance liquid chromatography
TLC	=	thin layer chromatography
Amv	=	avermectin
LD50	=	lethal dose 50
DDT	=	Dichloro diphenyl trichloroethane
DE	=	Dextrose equivalence
LB	=	Luria-Bertani
RT	=	retention time
YE	=	yeast extract

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

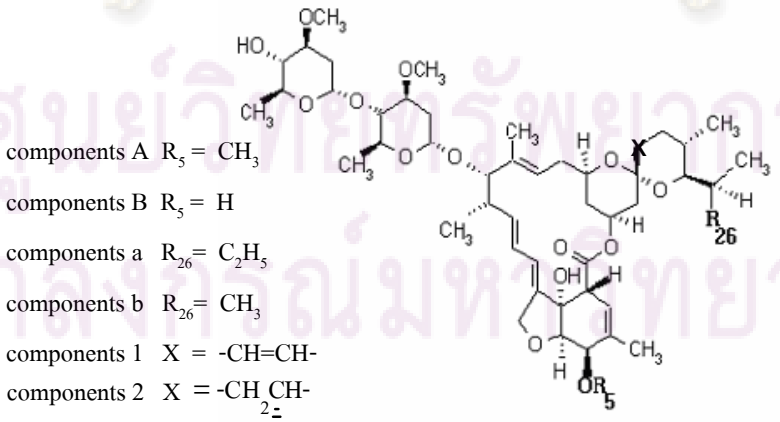
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งผลผลิตและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นจำนวนมาก ประเทศไทยประสบปัญหาการระบาดของแมลงศัตรูพืชมากมายเช่นเดียวกับประเทศในเขตร้อนอื่นๆ ทั่วโลก เนื่องจากสภาพอากาศเหมาะสม มีการปลูกพืชอาหารอยู่ตลอดปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งแมลงศัตรูพืชในวงศ์ Noctuidae ระบาดทำลายพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย แมลงในวงศ์นี้ที่เป็นศัตรูพืชที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ หนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* (Hubner) และหนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* สามารถทำลายพืชสำคัญทางเศรษฐกิจได้มากกว่า 20 ชนิด และพบการระบาดได้ตลอดทั้งปี (อุทัย เกตุนุติ และคณะ , 2538) นอกจากนี้ FAO รายงานว่าปริมาณผลผลิตทางการเกษตรทั่วโลกลดลง 120 ล้านดอลลาร์สหรัฐอเมริกา เกิดจากการทำลายของจุลชีพก่อโรคและแมลงศัตรูพืช (Zhou และคณะ, 2001) การใช้สารฆ่าแมลงเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยกำจัดและหยุดยั้งการทำลายพืชผลจากแมลงศัตรูพืช ซึ่งสารฆ่าแมลงแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ สารฆ่าแมลงที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีและสารฆ่าแมลงชีวภาพ (bio-insecticides) ที่ได้จากสารสกัดจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ไพรีทรินเป็นสารฆ่าแมลงชีวภาพที่สกัดได้จากดอกไพรีทรัมมีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าแมลงเกือบทุกชนิด สลายตัวได้ง่ายและ ไม่ตกค้างอยู่ในพืชผลและธรรมชาติ นอกจากนี้ยังไม่พบว่ามีแมลงชนิดใด ที่สามารถสร้างความต้านทานต่อสารไพรีทริน (สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, 2519) ดังเช่นสารฆ่าแมลงที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ด้วยต้นทุนการผลิตไพรีทรินที่สูง และมีราคาแพงมากเมื่อเปรียบเทียบกับสารฆ่าแมลงที่ได้จากการสังเคราะห์ จึงไม่เป็นที่นิยม ดังนั้นสารฆ่าแมลงจากจุลินทรีย์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากใช้ต้นทุนการผลิตต่ำ สภาวะที่ใช้ในการผลิตไม่ขึ้นกับทำเลที่ตั้งและฤดูกาล ใช้ระยะเวลาสั้น ใช้พื้นที่น้อย สามารถผลิตปริมาณมากๆได้ เมื่อเลี้ยงอยู่ในอาหารและสภาวะที่เลี้ยงเหมาะสม จึงได้รับความสนใจจากนักวิจัยและนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกเพิ่มมากขึ้น

Streptomyces sp. เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Actinomyces สามารถพบได้ง่ายในธรรมชาติ เช่น ในดิน แหล่งน้ำจืดและน้ำทะเล จุลินทรีย์กลุ่มนี้เป็นที่รู้จักกันมานานว่าสามารถผลิตสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิต่างๆ ที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ได้แก่ เตตราซัยคลิน (tetracycline), อิริโทรมัยซิน (erythromycin), สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) และ คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) เป็นต้น สารต้านมะเร็ง เช่น daunorubicin, enediynes และ idarubicin เป็นต้น และรวมถึงสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของสารฆ่าแมลงชีวภาพใน

อุตสาหกรรม (Shi, 2000) ในกลุ่มของ avermectin โดยผลิตจาก *Streptomyces avermitilis* (Deshpande และคณะ, 1988) ที่มีการผลิตในปริมาณสูงทางการค้า จากรายงานของ Xiong และคณะ (2004) แยก *Streptomyces* sp. 173 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่พบในทะเลสามารถผลิตสารฆ่าแมลงในกลุ่ม avermectin โดยสารฆ่าแมลงจากจุลินทรีย์จัดเป็นสารฆ่าแมลงชีวภาพ (bio-insecticides) ซึ่งสลายได้ในธรรมชาติโดยแสงแดดและการย่อยจากจุลินทรีย์ในดิน ไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในธรรมชาติดังเช่นสารฆ่าแมลงที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี จึงช่วยลดมลพิษในสิ่งแวดล้อมและยังมีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำเมื่อเทียบกับสารฆ่าแมลงที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี จากรายงานการศึกษาความเป็นพิษฉับพลันของ avermectin โดย Lankas และ Gordon (1989) พบว่ามีความเป็นพิษค่อนข้างน้อย โดยมีค่า LD_{50} เท่ากับ 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัมในหนูที่ได้รับ avermectin ทางปาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับยาพาราไธออน ที่มีรายงานผล LD_{50} เท่ากับ 3.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในหนูที่ได้รับยาพาราไธออนโดยการกินโดยตรง (Liechtenstein และคณะ, 1971) นอกจากสารฆ่าแมลงในกลุ่ม avermectin แล้วยังมีรายงานว่า *Streptomyces hygroscopicus* สามารถผลิต milbemycin (Deshpande และคณะ, 1988) รวมทั้ง *Streptomyces nanchangesis* ก็สามารถผลิต meilingmycin (Ouyang และคณะ, 1996) ซึ่งออกฤทธิ์ฆ่าแมลงได้

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารฆ่าแมลง เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน, แหล่งไนโตรเจน, วิตามินและ แร่ธาตุต่างๆ ดังมีรายงานของ Mironov และคณะ (2003) พบว่าการผลิต avermectins ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่ม macrolides ดังแสดงในรูปที่ 1 โดย *Streptomyces avermitilis* แปรผันตามชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ โดยการผลิตที่มีปริมาณกลูโคสจำกัดจะเพิ่มอัตราส่วนองค์ประกอบ A และ a แต่จะลดปริมาณองค์ประกอบ 1 นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มากเกินพอ จะมีผลยับยั้งการสร้าง avermectins



components A $R_5 = CH_3$

components B $R_5 = H$

components a $R_{26} = C_2H_5$

components b $R_{26} = CH_3$

components 1 X = -CH=CH-

components 2 X = $-CH_2-\underset{OH}{CH}-$

รูปที่ 1.1 โครงสร้าง avermectins

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในปี 1994 Warr และคณะ รายงานการผลิต milbemycin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม macrolides ก็พบว่าแปรผันตามชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ โดยถ้าใช้ฟรักโทส หรือแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ผลผลิตสูงกว่ากลูโคส นอกจากนั้นปริมาณผลผลิตจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เพิ่มขึ้น และสัดส่วนองค์ประกอบของ milbemycin เชิงซ้อนยังถูกควบคุมด้วยอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ถ้าอัตราส่วนไม่สมดุล จนไม่มีการสร้าง milbemycin เลย จะเรียกค่านี้ว่าจุดวิกฤต อย่างไรก็ตามยังพบว่า การเพิ่มปริมาณของคาร์บอนในอาหารจะทำให้มีการเพิ่มระยะเวลาในการผลิตมากกว่าการเพิ่มขึ้นของอัตราการผลิต ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Zhuang และคณะ (2006) ที่กล่าวว่าการให้แหล่งคาร์บอนปริมาณมากจะช่วยเพิ่มระยะเวลาในการผลิต meilingmycin โดย *Streptomyces nanchangensis* ได้มากขึ้น ในขณะที่การให้ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นกลับทำให้การผลิตลดลง ซึ่งเป็นไปได้ว่าการผลิต meilingmycin จะเกิดขึ้นหลังจากมีการใช้กรดอะมิโนหมดไป ดังนั้นจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำจะให้ผลผลิตของ meilingmycin ที่สูงกว่าที่ระดับของไนโตรเจนที่ความเข้มข้นสูงๆ ธาตุอาหารและแร่ธาตุต่างๆ มีอิทธิผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ จากการทดลองของ Gesheva และคณะ (2004) พบว่า Cu^{2+} ,Fe^{2+}, และ Mn^{2+} กระตุ้นการสร้างสารปฏิชีวนะ AK-111-81 ที่ได้จาก *Streptomyces hygroscopicus* ได้มากขึ้น นอกจากส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อมีส่วนสำคัญต่อการผลิตสารฆ่าแมลงจากจุลินทรีย์แล้ว อุณหภูมิและความเป็นกรดเป็นด่างของสภาวะที่ใช้เลี้ยง *Streptomyces* sp. ก็มีส่วนสำคัญต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง (Pandey และ Ma, 2005)

งานวิจัยที่ได้ดำเนินการมาแล้วได้คัดกรอง *Streptomyces* ทั้งหมด 359 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย (Sujitwanit และคณะ, 2007) พบว่ามี 5 สายพันธุ์ ให้ผลทดสอบเบื้องต้นที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าไรทะเล (*Artemia salina*) ซึ่งอยู่ในไฟลัมอาร์โธรโปดาเช่นเดียวกับแมลงได้ และพบว่า 3 ใน 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือก ได้แก่ สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงเมื่อทดสอบกับไรทะเลได้ค่อนข้างสูง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะหาองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ ปัจจัยต่างๆ และภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารออกฤทธิ์ดังกล่าวโดย *Streptomyces* spp. ทั้ง 3 สายพันธุ์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อหาองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. เตรียม brine shrimp (*Artemia salina*) และการทดสอบสารฆ่าแมลงกับ *Artemia salina*

2. ผลของแหล่งคาร์บอน ต่อการผลิตสารฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

3. ผลของแหล่งไนโตรเจน ต่อการผลิตสารฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

4. ผลของอุณหภูมิเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

5. ผลของระยะเวลาบ่มเชื้อต่อการผลิตสารฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

6. การหาความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ทำให้ไรทะเลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนเริ่มต้น (LD_{50})

7. การแยกสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสารสกัดหยาบโดยวิธีโครมาโทกราฟี (chromatography)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ ปัจจัยต่างๆ และภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงใน *Streptomyces* spp.สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

2.1 พัฒนาการของสารฆ่าแมลงและวิวัฒนาการการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย

เนื่องจากความจำเป็นในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ทำให้มีการนำสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มต่างๆมาใช้อย่างมากมาย และมีปริมาณการใช้รวมเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆอย่างต่อเนื่อง มีรายงานว่าในปี พ.ศ.2537 มูลค่าการจำหน่ายสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ซึ่งใช้ในการเกษตรในตลาดทั่วโลก มีมูลค่ารวม 27,825 ล้านเหรียญสหรัฐ หรือคิดเป็นอัตราการเพิ่มประมาณร้อยละ 10 เมื่อเปรียบเทียบกับมูลค่าการจำหน่ายในปี 2536 จากการจำแนกสัดส่วนการใช้ตามภูมิภาค พบว่าภาคพื้นอเมริกาเหนือมีปริมาณการใช้สูงสุดประมาณ ร้อยละ 29.8 รองลงมา ได้แก่ เอเชียตะวันออก (ร้อยละ 28.1) ยุโรปตะวันตก (ร้อยละ 24.2) ลาตินอเมริกา (ร้อยละ 9.2) ยุโรปตะวันออก (ร้อยละ 3.4) และภูมิภาคอื่นๆ(ร้อยละ5.3) (สุภาณี พิมพ์สมาน, 2540)

กลุ่มพืชที่มีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชมากที่สุด คือ ผัก คิดเป็นร้อยละ 24.7 รองลงมาได้แก่ ธัญพืช ข้าว และข้าวโพด โดยคิดเป็นร้อยละ 14.2 , 13.0 และ 11.2 ตามลำดับ (สุภาณี พิมพ์สมาน, 2540)

2.1.1 พัฒนาการของสารฆ่าแมลง

การใช้สารฆ่าแมลงในยุคแรกเริ่มประมาณ 500 ปีก่อนพุทธศักราช (หรือประมาณ 1000 ปีก่อนคริสตศักราช) ได้มีการเขียนอ้างอิงเป็นครั้งแรกถึงการใช้กำมะถันผงรมควันเพื่อการป้องกันกำจัดแมลง ต่อมาในปี พ.ศ. 600-700 มีการใช้สารประกอบอาร์ซีนิก (arsenic compound) เป็นสารฆ่าแมลง ประมาณ พ.ศ. 2200-2300 ได้มีการเริ่มใช้สารจากพืชซึ่งได้จากธรรมชาติ ได้แก่ นิโคติน (nicotine) จากใบยาสูบ โรตีโนน (rotenone) จากรากพืชในสกุล *Derris* และไพรีทรัม (pyrethrum) จากดอกของพืชสกุล *chrysanthemum* ตามลำดับ ปี พ.ศ.2410 มีการผลิตนิโคตีนซัลเฟต (nicotine sulfate) 40% ในรูปของเหลวเพื่อจำหน่าย แต่การใช้ได้ลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 การสังเคราะห์สารเคมีเพื่อใช้เป็นสารฆ่าแมลงเริ่มขึ้นประมาณปี พ.ศ.2435 สารเคมีซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นใช้เป็นสารฆ่าแมลงชนิดแรกๆ คือ ไดไนโตร-โอ-ครีซอล (dinitro-o-cresol) และไทโอไซยาเนต (thiocyanate) ยุคของการใช้สารฆ่าแมลงอินทรีย์สังเคราะห์อย่างจริงจังเริ่มจากช่วงปลายสงครามโลกครั้งที่ 2 สารฆ่าแมลงอินทรีย์สังเคราะห์ชนิดแรกที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางทั้ง

ในการเกษตรและการสาธารณสุข คือ dichloro diphenyl trichloroethane (DDT) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) DDT ถูกผลิตออกขายในปี พ.ศ. 2485 สารอินทรีย์สังเคราะห์กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (organophosphorus) ชนิดแรกที่สังเคราะห์ขึ้น คือ tetraethylpyrophosphate (TEPP Schradan) เป็นสารฆ่าแมลงประเภทเคลื่อนย้ายได้ (systemic insecticide) ชนิดแรกที่ผลิตออกขาย การใช้สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสนั้น เริ่มขึ้นระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 เช่นเดียวกับ DDT ในปัจจุบันออร์กาโนฟอสฟอรัสเป็นสารฆ่าแมลงกลุ่มสำคัญ ซึ่งมีปริมาณการใช้และมีจำนวนชนิดมากที่สุด สารอินทรีย์สังเคราะห์กลุ่มต่อมาที่มีการพัฒนาขึ้นใช้เป็นสารฆ่าแมลง คือ สารคาร์บาเมต (carbamate) ต่อมามีการสังเคราะห์สารฆ่าแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ (synthetic pyrethroid) เป็นสารสังเคราะห์เลียนแบบสารไพรีทริน (pyrethrin) ซึ่งสกัดได้จากดอกไพรีทรัม เนื่องจากความต้องการที่จะผลิตสารฆ่าแมลงซึ่งมีพิษต่อสัตว์เลือดอุ่นต่ำ และไม่มีความคงทนในสภาพแวดล้อม การสังเคราะห์สารฆ่าแมลงเลียนแบบสารไพรีทรินทำได้สำเร็จชนิดแรกในปี พ.ศ. 2493 (Elliott และคณะ 1973) ตารางที่ 2.1 แสดงประวัติการใช้สารฆ่าแมลง (สุภาณี พิมพ์สมาน, 2540)

ในปัจจุบัน มนุษย์มีความห่วงใยในการรักษาดุลธรรมชาติและระบบนิเวศมากขึ้น สารไพรีทรอยด์สังเคราะห์แม้จะมีพิษตกค้างสั้น แต่ก็มีปัญหาในเรื่องความไม่คงทนในสภาพแวดล้อม นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามที่จะค้นคว้าหาสารฆ่าแมลงกลุ่มใหม่ๆขึ้นมาทดแทน การวิจัยในปัจจุบันยังมุ่งเน้นเกี่ยวกับการค้นคว้าหาโครงสร้างทางเคมีของสารฆ่าแมลงชนิดใหม่ๆจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural product) เช่น จากพืชหรือที่สร้างโดยจุลินทรีย์ เพื่อนำมาใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาสารฆ่าแมลงชนิดใหม่ที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างไปจากเดิม เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการสร้างความต้านทานของแมลง เช่น การพบสารอะเวอร์เมกติน (avermectins) ซึ่งผลิตโดยจุลินทรีย์ในดินคือ *Streptomyces avermitilis* (Burg และคณะ, 1979) เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 ประวัติการใช้สารฆ่าแมลงอินทรีย์สังเคราะห์กลุ่มหรือชนิดต่างๆ

ปี พ.ศ.	สารฆ่าแมลง
2475-2484	กลุ่มไดไนโตร-โอ-ครีซอล
	กลุ่มไทโอไซยาเนต
2485-2494	กลุ่มออร์กาโนคลอรีน : DDT , aldrin, chlordane, toxaphene
	กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส : parathion, methyl parathion
	กลุ่มคาร์บาเมต : dimeton, dimetilan
2495-2504	กลุ่มคาร์บาเมต : carbaryl
	กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส : malathion, azinphos-methyl
2505-2514	กลุ่มคาร์บาเมต : carbofuran, bufencarb, aldicarb, methomyl
	กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส : fonofos
	กลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ : resmethrin
	กลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ : cypermethrin, permethrin, decamethrin, fenvalerate
2514-2524	กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส : terbufos, acephate, methamidophos
	กลุ่มคาร์บาเมต : bendiocarb
	กลุ่มฟอร์มามิดีน : chlordimeform, amitraz
	สารจุลินทรีย์ฆ่าแมลง : *Bacillus thuringiensis* (Bt)
	สารยับยั้งการสร้างไคทิน : nuclear polyhedrosis virus
	สารคล้ายจูวีไนล์ฮอร์โมน : methoprene
2525-ปัจจุบัน	สารยับยั้งการสร้างจูวีไนล์ฮอร์โมน
	อะเวอร์เมกติน
	กลุ่มคลอโรนิโคตินีล (chloronicotinyl) : imidacloprid
	อื่นๆ : diafenthiuron

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 วิวัฒนาการการใช้สารป้องกันศัตรูพืชในประเทศไทย

การใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย โดยเฉพาะสารเคมีสังเคราะห์ เริ่มในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 โดยมีการนำเข้า DDT มาใช้กำจัดยุง ซึ่งเป็นพาหะของเชื้อมาลาเรีย และใช้ในการกำจัดแมลงเพื่อสุขอนามัยให้แก่ทหารฝ่ายสัมพันธมิตร หลังสงครามโลกสงบลง มีการนำ DDT ไปกำจัดยุงและแมลงวัน จากนั้นได้มีการใช้สารเคมีสังเคราะห์เพิ่มขึ้นอีกหลายชนิด ในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ต่อมามีการใช้สารจำพวกออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต ตามมาในเวลาไล่เลี่ยกัน ในยุคหลังปี พ.ศ.2500 เป็นต้นมา การใช้สารเคมีสังเคราะห์ในประเทศไทยมีปริมาณสูงขึ้น มีรายงานว่าในปี พ.ศ.2500 ประเทศไทยสั่งสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชเข้ามาใช้คิดเป็นน้ำหนักสารออกฤทธิ์ประมาณ 2,000 ตัน ในปี พ.ศ.2505 มีปริมาณถึง 4,000 ตัน จนกระทั่งปี 2544 เพิ่มขึ้นเป็น37,039 ตัน (ตารางที่ 2.2) การใช้สารเคมีในยุคแรกๆ คงใช้เพียงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน, ออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต เป็นส่วนมาก สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชได้มีการพัฒนาและสังเคราะห์สาร ชนิด และกลุ่มใหม่ๆตลอดเวลา เช่นสารไพรีทรอยด์ สารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์ (กรมวิชาการเกษตร, 2549)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณการนำเข้าสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตร ปี 2525-2544

ประเภทสาร	2525	2529	2534	2539	2544
	ปริมาณ (ตัน/สารออกฤทธิ์)				
สารกำจัดแมลง	2,890	5,799	5,560	6,479	9,059
สารป้องกันกำจัดโรคพืช	1,683	2,512	2,087	4,446	5,384
สารกำจัดวัชพืช	2,983	4,262	7,071	14,041	20,958
อื่นๆ	94	204	311	576	1,638
รวม	7,650	12,777	15,029	25,542	37,039

แหล่งข้อมูล: กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การจำแนกกลุ่มของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจัดแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆได้ดังนี้คือ

2.2.1 สารฆ่าแมลงอนินทรีย์ (inorganic insecticide) สารฆ่าแมลงอนินทรีย์เป็นสารฆ่าแมลงในยุคแรก ที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนปัจจุบันมีปริมาณการใช้ไม่มากนัก ได้แก่ อาซีนิคอล (Arsenical) สารฆ่าแมลงอาซีนิคอล เป็นชนิดแรกที่นำมาใช้เป็นสารฆ่าแมลง ในปี พ.ศ. 2407 เพื่อใช้กำจัดศัตรูมันฝรั่งในสหรัฐอเมริกา (Loebenstein, 1994) จากรายงานของ Mitsuhashi และคณะ (1970) พบว่า สารกลุ่มอาซีนิคอลที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ของแมลงปากดูด *Antheraea eucalypti* ได้ ปัจจุบันไม่นิยมใช้เนื่องจากมีพิษต่อพืช

2.2.2 สารฆ่าแมลงอินทรีย์ (organic insecticide)
สารฆ่าแมลงอินทรีย์แบ่งออกเป็น สารอินทรีย์สังเคราะห์และสารอินทรีย์ธรรมชาติ

2.2.2.1 สารอินทรีย์สังเคราะห์ (Synthetic organic insecticide)
ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) เช่นกลุ่มของ DDT เป็นสารฆ่าแมลงที่มีการใช้แพร่หลายทั่วโลก DDT ได้รับการยกย่องว่าเป็นสารฆ่าแมลงสมบูรณ์แบบ เพราะมีพิษต่อแมลงมากชนิด มีความคงทนออกฤทธิ์อยู่ได้นานและราคาถูก มีค่า LD_{50}จากการทดลองกับหนู โดยการให้สารทางปาก เท่ากับ 113 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณการใช้ DDT เริ่มลดต่ำลงภายหลังปี พ.ศ. 2514 เนื่องจากปัญหามลภาวะในสิ่งแวดล้อมและการสร้างความต้านทานโดยแมลงศัตรู นอกจากนี้ยังมีการสะสมตกค้างในสายใยอาหารอีกด้วย (Quintero และคณะ, 2005) ได้มีการประกาศห้ามใช้ DDT ในประเทศที่พัฒนาแล้วหลายประเทศ รวมทั้งสหรัฐอเมริกา ซึ่งประกาศห้ามใช้ แต่ยังมีการผลิตเพื่อส่งขายประเทศกำลังพัฒนาเพื่อใช้ในการควบคุมโรคมาลาเรีย ในประเทศไทย กระทรวงเกษตรประกาศว่า DDT เป็นวัตถุอันตรายห้ามใช้ทางการเกษตร เมื่อมีนาคม 2526 (http: // 210.246.186.28/ard/Show Forums.aspx?id=11;19/8/51)

ออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate) เป็นยาปราบศัตรูพืชที่ใช้กันมากในขณะนี้ ซึ่งมีอยู่หลายอย่างด้วยกัน ที่รู้จักกันดี คือ มาลาไธออน (Malathion) หรือในนามของยาโฟลิดอล (Folidol), E 605 หรือยาเขียวฆ่าแมลงหรือยาฆ่าแมลงตราหัวกะโหลกไขว้ ยานี้ได้มีหลายบริษัทผลิตออกจำหน่าย โดยชื่อทางการค้าต่าง ๆ กัน เช่น อีคาท็อกซ์ (Ekatox), เพอร์เฟคไธออน (Perfekthion), เมทาซีสต๊อกซ์ (Metasystox), โอโซ (OZo), ออร์โธฟอส (Orthophos), พาราเฟต (Paraphate) เป็นต้น ในปัจจุบันมาลาไธออนกำลังเป็นต้นเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของ "อันตรายอันเกิดจากสิ่งมีพิษ" โดยปกติร่างกายเมื่อมีการทำงานของระบบประสาทต่าง ๆ จะเกิดสารเคมีชนิดหนึ่ง

เรียกว่าอะเซทิลโคลิน (acetylcholine) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสื่อนำกระแสประสาทผ่านไปยังอวัยวะที่เส้นประสาทนั้นไปเลี้ยง และจะถูกย่อยและสลายไปตามธรรมชาติในร่างกายโดยเอนไซม์ที่เรียกว่าโคลินเอสเตอร์เรส (cholinesterase) และจะเกิดขึ้นมาใหม่อีกเมื่อมีการกระตุ้นของระบบประสาทดังกล่าว การออกฤทธิ์ของยาฆ่าแมลงพวกนี้เมื่อเข้าไปในร่างกายจะไปจับกับเอนไซม์โคลินเอสเตอร์เรส กลายเป็นสารคงทนถาวรสลายตัวได้ยาก และกินเวลานาน ฉะนั้นจึงไม่มีเอนไซม์ไปย่อยหรือสลายอะเซทิลโคลิน ที่เกิดขึ้นในร่างกายให้หมดไปตามธรรมชาติ ดังนั้นร่างกายจะมีอะเซทิลโคลินคั่งหรือเพิ่มมากขึ้นทุกที จนเกิดเป็นพิษต่อร่างกาย ฉะนั้นพิษของพาราไธออนก็คือการที่มีอะเซทิลโคลินในร่างกายเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาการที่เกิดจากพิษพาราไธออนก็เหมือนกับการกระตุ้นประสาทที่ไปเลี้ยงอวัยวะต่างๆ (Baker และคณะ, 1985; Aygun,2004)

คาร์บาเมต (carbamate) สารฆ่าแมลงในกลุ่มคาร์บาเมตที่ใช้ในปัจจุบัน ถึงแม้จะมีไม่มากชนิด แต่มีความสำคัญในการกำจัดแมลงได้ดี คาร์บาเมตที่ใช้เป็นสารฆ่าแมลงทั้งหมดเป็นเอสเทอร์ของกรดคาร์บามิก (carbamic acid) สารฆ่าแมลงในกลุ่มคาร์บาเมตมีประมาณ 20 ชนิด ตัวอย่างเช่น คาร์บาริล (Carbaryl) นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเป็นเวลานานแล้ว เนื่องจากใช้กำจัดแมลงได้มากชนิดในลักษณะสัมผัสตาย โดยมีค่า LD_{50}จากการทดลองกับแมลงจำพวกตั๊กแตนเท่ากับ 31 ไมโครกรัมต่อกรัม (Elliott, 1976)

ไพรีทรอยด์สังเคราะห์ (synthetic pyrethroid) เป็นกลุ่มของสารฆ่าแมลงซึ่งได้จากการสังเคราะห์เลียนแบบโครงสร้างพื้นฐานของไพรีทริน มีฤทธิ์เป็นยาฆ่าแมลงเช่นเดียวกัน ข้อดีคือไม่สลายตัวได้ง่ายเหมือนกลุ่มไพรีทริน ออกฤทธิ์เร็ว มีพิษสูง ฆ่าแมลงได้มากชนิด มีพิษต่อสัตว์เลือดอุ่นต่ำ และไม่ทำให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม แต่ก็มีข้อเสียเนื่องจากไม่ปลอดภัยต่อแมลงที่มีประโยชน์ เช่น ผึ้ง และแมลงตัวห้ำต่างๆ นอกจากนี้ยังมีพิษสูงมากต่อสัตว์น้ำ เช่น ปลา และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังต่างๆ ที่อยู่ในน้ำ ตัวอย่าง เช่น permethrin มีค่า LD_{50} จากการทดลองกับปลาชนิดต่างๆ อยู่ระหว่าง 1-140 ไมโครกรัมต่อลิตร (Elliott และคณะ, 1973)

จะเห็นได้ว่าการใช้ยาฆ่าแมลงที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงได้ดี และรวดเร็ว แต่ข้อเสียคือ มีการสะสมอยู่ในธรรมชาติก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมและเป็นอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใช้ นอกจากนี้ปัญหาการดื้อยาของแมลง ทำให้เกษตรกรต้องฉีดพ่นปริมาณยาฆ่าแมลงที่เพิ่มขึ้น ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างเพิ่มมากขึ้น การใช้สารเคมีฆ่าแมลงที่เป็นพิษร้ายแรงที่สามารถฆ่าแมลงได้ทุกชนิด ไม่เฉพาะเจาะจงและใช้อย่างพร่ำเพรื่อ เกินความจำเป็น ทำให้แมลงที่เป็นประโยชน์ถูกทำลายไปด้วย สำหรับแมลงที่เป็นประโยชน์สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ แมลงที่ให้ผลผลิต แมลงที่ใช้เป็นอาหาร แมลงผสมเกสร แมลงที่ช่วย

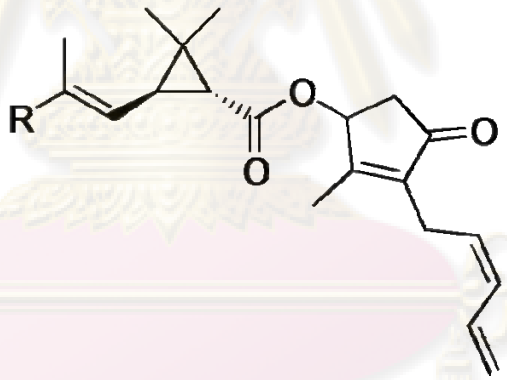
สร้างเสริมความอุดมสมบูรณ์ของดิน แมลงตัวห้ำ และแมลงตัวเบียนทำให้ความสมดุลทางนิเวศวิทยาเปลี่ยนไป

2.2.2.2 สารอินทรีย์ธรรมชาติ

2.2.2.2.1 สารฆ่าแมลงจากพืช (Botanical insecticide)

สารฆ่าแมลงจากพืชที่มีการใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ ไพรีทริน โรตีโนน นิโคตีน และสะเดา เป็นต้น

ไพรีทริน (Pyrethrin) เป็นสารซึ่งสกัดได้จากส่วนของพืชในวงศ์ Compositae สกุล *Chrysanthemum* มีชื่อสามัญเรียกทั่วไปว่า ไพรีทรัม (pyrethrum) สารออกฤทธิ์ที่สำคัญมี 6 ชนิด เรียกรวมว่า ไพรีทริน ไพรีทรินมีพิษสูง ฆ่าแมลงได้มากชนิดอย่างรวดเร็วในลักษณะสัมผัสตาย และมีพิษต่ำต่อสัตว์เลือดอุ่น นอกจากนี้ไพรีทรินยังมีคุณสมบัติในการน๊อก-ดาว (knock-down) แมลงได้ดีอีกด้วย ไพรีทรินมีข้อเสียที่สลายตัวรวดเร็ว โดยเฉพาะเมื่อถูกแสงอัลตราไวโอเลตในแสงแดด จึงจำเป็นต้องมีวิธีการผลิตและการเก็บรักษาที่ดี และราคาค่อนข้างแพงเนื่องจากต้นทุนการผลิตสูง รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างไพรีทริน



รูปที่ 2.1 โครงสร้างไพรีทริน

สะเดา (*Azadirachta indica* A. Juss.) สารที่สกัดได้จากสะเดาส่วนใหญ่ได้แก่ azadirachtin, salannin และ nimbin โดย azadirachtin มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลง ส่วน salannin และ nimbin เป็นสารไล่ และยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง (กองกีฏและสัตววิทยา, 2547) สะเดาสามารถควบคุมเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยกระโดดได้ดี และยังสามารถควบคุมหนอนใยผักได้ (Graigne and Ahmed, 1988; โศรยา พันธุ์วิริยาพงษ์, 2531) ใช้ใบสะเดาแก่ 200 กรัม ทำให้ละเอียดหมักในน้ำ 1 ลิตร ทิ้งไว้ 2 คืน กรองเอากากออก สามารถป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ผักและหนอนใยผักได้ (Jacobson and Crosby, 1971) ข้อเสียของสะเดาคือ ฤทธิ์ของสารสกัดสะเดาจะลดลงในสภาพที่มี

แดด ซึ่งมีรังสีอัลตราไวโอเลต ฉะนั้นจึงควรใช้สารสกัดสะเดาในเวลาเย็น (อารยา จาติเสถียร, 2540)

พืชสมุนไพรบางชนิดที่มีสารฆ่าและไล่แมลง

ณรรฐพล วัลลีย์ลักษณ์ (2531) รายงานว่าเปลือกของแคฝรั่ง *(Sesbania grandiflora* Pers.) เป็นส่วนที่ใช้ทำยาฆ่าแมลงได้ สมพร หิรัญรามเดช (2534) รายงานว่าแคฝรั่ง เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ฆ่าแมลงได้

ณรรฐพล วัลลีย์ลักษณ์ (2531) รายงานว่า ลำต้น ใบและดอกของขี้เหล็ก (*Cassia siamea* Britt.) ใช้เป็นยาฆ่าแมลงได้ อำนวย อิศรางกูร ณ อยุธยา และอรรณพ ตันสกุล (2535) กล่าวว่าใบ ดอก และผลของขี้เหล็กมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายเพลี้ยอ่อน

วุฒิกรณ์ รอดความทุกข์ (2538) ทำการทดลองกับพืชสมุนไพรที่มีสารฆ่าและไล่แมลงบางชนิดคือ สะเดา แคฝรั่ง ดองดึง คูน หนอนตายหยาก และสารภี โดยใช้พืชสมุนไพร 200 กรัม หมักในน้ำปริมาณ 4 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองปรากฏว่า หนอนตายหยากและสารภี มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชดีที่สุด

จะเห็นว่าสารสกัดจากพืชมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงได้ดี ซึ่งสามารถใช้ทดแทนหรือลดการใช้สารฆ่าแมลงที่สังเคราะห์ทางเคมีได้อีกทางหนึ่ง ข้อดีอีกอย่างของสารฆ่าแมลงจากพืชคือสลายตัวได้ง่าย ไม่ตกค้างอยู่ในพืชผลและธรรมชาติเป็นเวลานาน นอกจากนี้ยังไม่พบว่าแมลงใดๆ สามารถสร้างความต้านทานต่อสารไพรีทริน (สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, 2519) ดังเช่นสารฆ่าแมลงที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ข้อจำกัด คือ สารฆ่าแมลงจากพืชมีต้นทุนการผลิตที่สูง ตัวอย่างเช่น ไพรีทรินต้องเก็บในช่วงระยะที่ดอกชั้นในบานประมาณ 3 แถว หรือประมาณร้อยละ 50 ต่อจากนั้นเมื่อดอกชั้นในบานมากขึ้น ปริมาณสารไพรีทรินจะลดน้อยลงเรื่อยๆ การเก็บดอกไพรีทรัมจึงต้องทำเป็นระยะๆ โดยใช้มือเลือกเก็บเฉพาะดอกที่เหมาะสม ซึ่งเป็นสาเหตุอย่างหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง และพบว่าสารฆ่าแมลงที่ได้จากพืชสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน ต้องทำการฉีดพ่นบ่อย และมีราคาแพงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารฆ่าแมลงที่สังเคราะห์ทางเคมี

2.2.2.2.2 สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ได้จากสัตว์

สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่สร้างจากสัตว์นั้นยังไม่มีรายงาน แต่จะอยู่ในรูปของการใช้เป็นตัวควบคุม กำจัดแมลงศัตรูพืช ได้แก่

แตนเบียนไข่ *Trichogramma* spp. หรือแตนตาแดง ช่วยทำลายไข่ที่มีลักษณะไม่มีขนปกคลุมและไข่ที่มีอายุ 1-2 วันของผีเสื้อต่างๆ หลายชนิด เช่น หนอนกอลายเล็ก *Chilo infuscatellus*, หนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera*, หนอนใยผัก *Plutella xylostella*, หนอนสะไปนี่ *Earias vittella*, หนอนแก้วส้ม *Papilio demoleus malayanus* เป็นต้น โดยแตนเบียนไข่ตัว

เมียจะทำลายผีเสื้อโดยเจาะแทงเข้าไปวางไข่ในไข่ผีเสื้อ ไข่ 1 ฟอง สามารถมีแตนเบียนไข่ได้ 1-4 ตัว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของอาหารภายในไข่ ไข่ของผีเสื้อที่ถูกแตนเบียนเจาะทำลายแล้ว 3 วัน จะเปลี่ยนเป็นสีดำ และจะไม่ฟักเป็นตัวหนอน หลังจากนั้น 8 วันจะฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัยของแตนเบียนไข่ ซึ่งจะผสมพันธุ์และไปทำลายไข่ของผีเสื้อต่อ (กองกีฏและสัตววิทยา, 2547)

มวนพิฆาต (stink bug) *Eocanthecona furcellata* เป็นแมลงห้ำในระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ทั้งเพศผู้และเพศเมีย มีปากแบบแทงดูด ดังนั้นจึงทำลายหนอนศัตรูพืชโดยใช้ปากแทงลงไปในลำตัวหนอนศัตรูพืช แล้วปล่อยสารพิษทำให้หนอนเป็นอัมพาต จากนั้นจะดูดกินของเหลวภายในลำตัวหนอนจนแห้งตายแล้วทิ้งซากเหยื่อเพื่อหาเหยื่อใหม่ต่อไป ตลอดชีวิตของมวนพิฆาตทำลายหนอนศัตรูพืชได้ประมาณ 256 ตัว มวนพิฆาตสามารถทำลายหนอนศัตรูพืชได้หลายชนิด โดยเฉพาะหนอนผีเสื้อ เช่น หนอนกระทู้หอม และหนอนเจาะสมอฝ้าย เป็นต้น และสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในสภาพสวนแสะสภาพไร่ เช่น องุ่น, ส้ม และฝ้าย เป็นต้น (กองกีฏและสัตววิทยา, 2547)

ไรตัวห้ำ (predatory mite) เป็นไรที่ไม่เป็นศัตรูพืช แต่เป็นตัวห้ำที่กินไรศัตรูพืชและแมลงที่มีขนาดเล็กเป็นอาหาร โดยใช้อวัยวะคล้ายคีม (chelicerae) จับและเจาะเข้าไปในตัวเหยื่อดูดกินของเหลวจนตัวเหยื่อแห้งตาย โดยมากชอบเจาะกินไข่และตัวอ่อนมากกว่าตัวเต็มวัย ไรตัวห้ำที่สำคัญอยู่ในวงศ์ Phytoseiidae มีขนาดใกล้เคียงกับไรศัตรูพืช (ประมาณ 0.5 มม.) มีวงจรชีวิตจากไข่เป็นตัวเต็มวัยประมาณ 4-5 วัน (กองกีฏและสัตววิทยา, 2547)

ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง (Entamopathogenic Nematodes) ไส้เดือนเป็นพาราสิตถาวรของแมลงบางชนิด มีการเจริญเติบโต ขยายพันธุ์ ผสมพันธุ์ในตัวแมลงแล้ววางไข่และฟักเป็นตัวอ่อน พอเข้าวันที่ 3 (ขนาด 0.2-0.5 มิลลิเมตร) จะเข้าทำลายแมลงให้ตายได้ ไส้เดือนฝอยสามารถเข้าทำลายแมลงหลายชนิดซึ่งเป็นแมลงอาศัยให้ตายได้ แมลงอาศัยเหล่านี้ได้แก่ หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก หนอนเจาะยอดผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนทำลายยาสูบ หนอนกอกล้วย หนอนห่อใบข้าว หนอนเจาะผลชมพู่ ด้วงเจาะลำต้นกล้วย ด้วงงวงมันเทศ เป็นต้น (กองกีฏและสัตววิทยา, 2547) ปัจจุบันในประเทศไทยมีการผลิตไส้เดือนฝอยชนิด *Neoplectana carpocapse* จำหน่ายในชื่อการค้าเนมาโทดิก 22 (Nematodik 22) (สุภาณี พิมพ์สมาน, 2540)

จะเห็นว่าการใช้ศัตรูธรรมชาติ ได้แก่ แตนเบียนไข่ มวนพิฆาต ไรตัวห้ำ และไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง สามารถทดแทนหรือลดการใช้สารฆ่าแมลง และยังเป็นการอนุรักษ์ศัตรูธรรมชาติ เพื่อสร้างความสมดุลให้กับระบบนิเวศได้อีกทางหนึ่ง แต่ข้อจำกัด คือ ต้องใช้ในปริมาณมาก และบ่อยครั้ง

2.2.2.2.3 สารจุลินทรีย์ฆ่าแมลง (Microbial insecticides)

มีการนำสารจุลินทรีย์ฆ่าแมลง ไปใช้ทดแทนการใช้สารเคมีกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากพบว่าสารเคมีก่อให้เกิดปัญหาข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์หลายประการหากใช้สารโดยขาดความรู้และความระมัดระวัง รวมทั้งผลที่มีกระทบต่อสิ่งแวดล้อม มีการตกค้างในอาหารซึ่งเกินค่าปลอดภัยต่อผู้บริโภค ปัจจุบันจึงมีผู้สนใจศึกษาหาสิ่งทดแทนสารเคมีเพื่อนำไปใช้ในการปราบศัตรูพืชให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และเป็นทางเลือกให้เกษตรกรอีกทางหนึ่ง

ความพยายามในการพัฒนาใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการกำจัดแมลง ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน ในประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย มีการสำรวจเพื่อค้นหาชนิดของจุลินทรีย์เพื่อศึกษารายละเอียดในการควบคุมกำจัดแมลง ตลอดจนความเป็นไปได้ในการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณจุลินทรีย์นั้นๆ ให้ได้จำนวนมาก อันจะนำไปสู่การผลิตสูตรสำเร็จที่เหมาะสม มีความคงทน และใช้ต้นทุนการผลิตต่ำ สิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างสารจุลินทรีย์ฆ่าแมลง จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆซึ่งมีการผลิตจำหน่าย

จุลินทรีย์	ชื่อผลิตภัณฑ์	แมลงเป้าหมาย
แบคทีเรีย		
- *Bacillus thuringiensis* ver.*kurstaki* (Bt)	Bactur®, Bactospeine®, Caterpillar Killer®	Caterpillars (larvae of moths and butterflies)
- *Bacillus thuringiensis* ver.*aizawai*	Certan®	Wax moth Caterpillars
- *Bacillus popilliae* and - *Bacillus lentimorbus*	Doom®, Japidemic®, Grub Attack®	Larvae (grubs) of Japanese beetle
เชื้อรา		
- *Beauveria bassiana*	Botanigard®, Mycotrol®, Naturalis®	Aphids, fungus gnats, mealy bugs, mites, thrips, whiteflies
- *Lagenidium giganteum*	Laginex®	Larvae of most pest mosquito species
โปรโตซัว		
- *Nosema locustae*	NOLO Bait®, Grasshopper Attack®	European cornborer caterpillars, grasshoppers and mormon crickets
ไวรัส		
-Gypsy moth nuclear polyhedrosis virus (NPV)	Gypchek® virus	Gypsy moth Caterpillars
-Tussock moth NPV	TM Biocontrol-1	Tussock moth caterpillars
-Pine sawfly NPV	Neochek-S®	Pine sawfly larvae
ไส้เดือนฝอย		
- *Steinernema feltiae, S. riobravis, S. carpocapsae and other Steinernema species*	Biosafe®, Ecomask®, Scanmask®	Larvae of a wide variety of soil-dwelling and boring insects

ที่มา: Weinzierl (1995)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบคทีเรีย เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการป้องกันกำจัดแมลงมากที่สุดในปัจจุบัน มีรายงานว่าแมลงเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียครั้งแรกในปี พ.ศ. 2421 แต่เพิ่งมีการผลิตออกขายในเชิงการค้าเมื่อประมาณ 30 ปีที่ผ่านมา และมีการนำมาใช้เพียงสกุลเดียว คือ *Bacillus* โดยเฉพาะชนิด *Bacillus thuringiensis* (Bt) สหรัฐอเมริกาเป็นประเทศแรกเริ่มที่ผลิตสปอร์ของ Bt ออกขายเพื่อใช้เป็นสารฆ่าแมลง (Registration Eligibility Decision Document, 1998) Bt เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งในอากาศ ดิน น้ำ ต้นไม้และใบไม้ ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ ลักษณะเฉพาะของ Bt คือ สามารถสร้างสารพิษ Delta-endotoxin เมื่อหนอนกินเข้าไป สารพิษจะไปทำลายระบบย่อยอาหาร หนอนจะหยุดกินอาหาร เคลื่อนไหวช้าลง และตายภายใน 1-2 วัน (กองกีฏและสัตววิทยา, 2547) Delta-endotoxin เป็นทอกซินที่ไม่ทนความร้อน มีลักษณะเป็นผลึกของโปรตีนซึ่งเป็นส่วนผสมของ toxin และ enzyme เกาะกันอยู่เป็นผลึก Bt เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจได้หลายชนิด เช่น หนอนกระทู้หอม หนอนใยผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกินใบปาล์ม หนอนผีเสื้อ หนอนเจาะลำต้นข้าวโพด เป็นต้น *Bacillus thuringiensis* (Bt) จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อระบบการเกษตรยั่งยืน เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะสูงต่อแมลงเป้าหมาย ปลอดภัยต่อแมลงศัตรูธรรมชาติและแมลงที่มีประโยชน์ Bt ถูกนำเข้ามาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในประเทศไทยครั้งแรกในปี 2512-จนกระทั่งถึงปัจจุบัน จากการค้นคว้าทดลองของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา พบว่า Bt สามารถนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้มากกว่า 15 ชนิด (อัจฉรา ตันติโชดก, 2538) การทดสอบความเป็นพิษของ Bt พบว่าไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์ พืช และแมลงที่มีประโยชน์ในช่วงของการทดลองเป็นระยะเวลา 2 ปี ในไร่ที่ทำการทดสอบ สำหรับความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูทดลองโดยการกิน พบว่าค่า LD_{50} เท่ากับ 3940 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (กองกีฏและสัตววิทยา, 2547)

เชื้อรา (Fungus) มีการนำเชื้อรามาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เชื้อราหลายชนิดควบคุมระดับประชากรของแมลงและไรให้อยู่ในระดับสมดุลได้ โดยเชื้อราที่ก่อโรคจะมีความเป็นอยู่แบบปรสิต (parasite) อาศัยอยู่ภายในลำตัวของสัตว์อาศัย ใช้เนื้อเยื่อภายในร่างกายเพื่อดำรงชีวิตและขยายพันธุ์ (Carner, 1976; Hajek และ Leger, 1994) เชื้อราที่เป็นสาเหตุทำให้แมลงและไรศัตรูพืชตายมีหลายสกุล เช่น *Entomophthora, Verticillium, Beauveria, Hirsutella, Metarhizium, Cordyceps, Culicinomyces* และ *Paecilomyces* (Lewis และคณะ, 1981; Samson และคณะ, 1988; Ferron และคณะ, 1991; Vey และคณะ, 1993; Humber, 1997; Fuka, 1998; Inglis และคณะ, 2001) นอกจากนี้เชื้อราบางชนิดจะสร้างสารเมแทบอไลท์ (toxic metabolite) ที่มีฤทธิ์รุนแรงและใช้ฆ่าแมลง เช่น destruxins จาก *Metarhizium anisopliae* (Peng และคณะ, 2005), hirsutellin A จาก *Hirsutella thompsonii* (Maimala และคณะ, 2002) และ beauvericin จาก *Beauveria* (Ganassi

และคณะ, 2002) สารพิษเหล่านี้จะยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของแมลง หรือเป็นสาเหตุให้แมลงตาย ปัจจุบันมีการใช้ราเป็นสารฆ่าแมลงมากขึ้น ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ราที่ใช้ฆ่าแมลงเช่น Biogreen ที่เป็น conidia ของ *M. anisopliae* ใช้ในการปราบแมลงศัตรูพืชในออสเตรเลีย (Milner, 2000)

ไวรัส (Virus) Nuclear Polyhedrosis virus (NPV) เป็นไวรัสกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำให้แมลงเป็นโรค และตายได้ NPV เป็นไวรัสที่จัดอยู่ในวงศ์ Baculoviridae หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า บาคูโลไวรัส (baculovirus) (Wood และ Hughes, 1996) เชื้อ virus NPV มีคุณสมบัติพิเศษที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงเป้าหมายเท่านั้น เช่น ไวรัส NPV ของหนอนกระทู้หอมจะเข้าทำลายเฉพาะหนอนกระทู้หอม หรือไวรัส NPV ของหนอนเจาะสมอฝ้าย จะเข้าทำลายเฉพาะหนอนเจาะสมอฝ้าย จึงมีความปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม (กรมวิชาการเกษตร, 2547) จากการทดสอบความเป็นพิษของเชื้อ virus NPV โดยการให้กินและการสูดหายใจหรือฉีดเข้าใต้ผิวหนังในสัตว์ทดลอง เช่น หนู กระต่าย สุนัข และลิงไม่พบอาการผิดปกติใดๆ (http://www.vet.ku.ac.th/course/malinee/pesticides 4.htm ; 25/5/2008) กลไกการควบคุมจำจัดแมลงคือ เมื่อหนอนได้รับไวรัส NPV จากการกินพืชที่พ่นไวรัส ไวรัสจะเข้าทำลายนิวเคลียสของเซลล์กระเพาะอาหารส่วนกลาง นิวเคลียสเซลล์เม็ดเลือด ไขมัน กล้ามเนื้อ ทางเดินอาหาร ท่อหายใจ และผนังลำตัว หนอนจะตายภายใน 2-7 วัน (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

จะเห็นว่าการใช้จุลินทรีย์กำจัดแมลงศัตรูพืช สามารถทดแทนหรือลดการใช้สารฆ่าแมลงสังเคราะห์ทางเคมี ใช้ต้นทุนการผลิตต่ำ สภาวะที่ใช้ในการผลิตไม่ขึ้นกับทำเลที่ตั้งและฤดูกาล ใช้ระยะเวลาสั้น ใช้พื้นที่น้อย สามารถผลิตปริมาณมากๆได้ เมื่อเลี้ยงอยู่ในอาหารและสภาวะที่เลี้ยงเหมาะสม แต่ข้อจำกัด เช่นการฉีดพ่น Bt และ NPV ควรฉีดพ่นเวลาเย็นเพื่อหลีกเลี่ยงความร้อนจากแสงแดด ซึ่งมีผลทำให้ประสิทธิภาพลดลง เป็นต้น

Streptomyces sp. เป็นแบคทีเรียที่นักวิจัยให้ความสนใจ เนื่องจากสารปฏิชีวนะกว่า 70-80% ผลิตได้จาก *Streptomyces* sp. ความสำคัญของ *Streptomyces* sp. คือ สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ได้แก่ สารปฏิชีวนะ เช่น เตตราซัยคลิน (tetracycline), อิริโทรมัยซิน (erythromycin), สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) และ คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) เป็นต้น สารต้านมะเร็ง เช่น daunorubicin, enediynes และ idarubicin เป็นต้น และยังสามารถสร้างสารฆ่าแมลง (Kieser และคณะ, 2000) จากรายงานการวิจัยพบว่า *Streptomyces avermitilis* สามารถสร้างสารฆ่าแมลงในกลุ่ม Avermectin

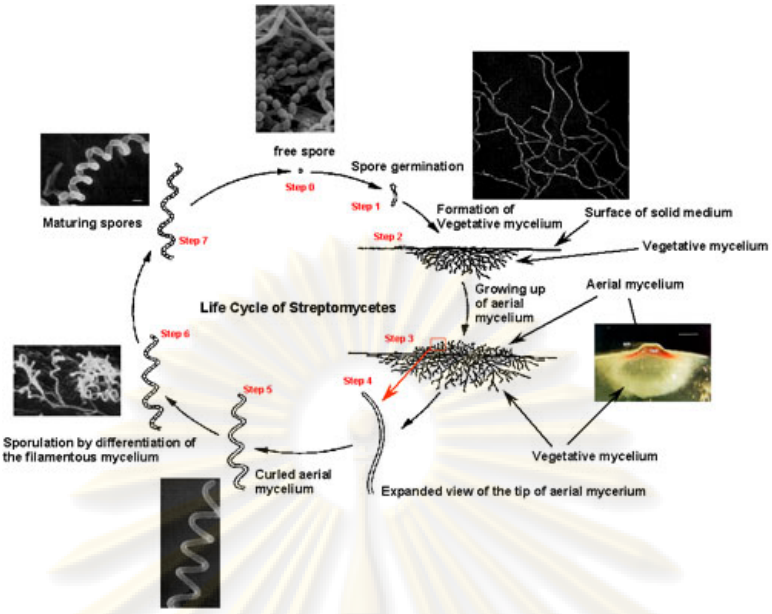
อะเวอร์เมกติน (Avermectins) เป็นสารฆ่าแมลงกลุ่มสารปฏิชีวนะ (antibiotic) โครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1.1 อะเวอร์เมกตินเป็นชื่อเรียกกลุ่มสารซึ่งสกัดแยกได้จากผลิตผลจากการหมัก (fermentation product) โดย *Streptomyces avermitilis* (Burg และคณะ, 1979) จุลินทรีย์ชนิดนี้พบครั้งแรกจากตัวอย่างดินในประเทศญี่ปุ่น ในการศึกษารายละเอียดพบว่า อะเวอร์เมกตินประกอบด้วยสาร 8 ชนิด มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลอยู่ในกลุ่มแมโครไซคลิกแลกโตน (macrocyclic lactone) (Mironov และคณะ, 2003) avermectin B1a เป็นชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลงดีที่สุด เมื่อทดสอบกับแมลงในอันดับ Hemiptera, Lepidoptera และ Coleoptera (ยกเว้นชนิด *Diabrotica undecimpunctata* ซึ่งอ่อนแอต่อ avermectin B2a มากกว่า) ดังนั้น avermectin B1a จึงมีการพัฒนาผลิตขายเป็นสารฆ่าแมลงในเชิงการค้า ในขบวนการผลิตอะเวอร์เมกติน ผลผลิตที่ได้จะมีส่วนผสมของ avermectin B1a และ avermectin B1b อยู่ในอัตราประมาณร้อยละ 80:20 เรียกชื่อว่า avermectin B1 หรือ abamectin ซึ่งในปัจจุบันชื่อ abamectin ได้รับความนิยมมากกว่า และใช้เป็นชื่อสามัญของสารฆ่าแมลง ในประเทศไทยมีจำหน่ายในชื่อการค้า อากริเมค (Agrimec) ใช้ได้ผลในการกำจัดแมลงศัตรูมากชนิด เช่น หนอนใยผัก หนอนคืบกะหล่ำ หนอนกระทู้หอม เพลี้ยไฟชนิดต่างๆ และไรขาว เป็นต้น abamectin มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลือดอุ่นต่ำ ค่า LD_{50} จากการทดลองกับหนูทางปาก มากกว่า 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อะเวอร์เมกตินสามารถฆ่า nematode และ arthropods ได้อย่างกว้างขวาง มีความเป็นพิษสูงต่อแมลง ไร และหมัด จะเป็นพิษต่อเส้นประสาทโดยกระตุ้น γ-aminobutyric acid ซึ่งเป็นสารเคมีส่งสัญญาณสร้างที่ปลายประสาท ซึ่งยับยั้งการติดต่อสื่อสารระหว่างเส้นประสาทถึงเส้นประสาท และเส้นประสาทถึงกล้ามเนื้อ ส่งผลให้แมลงเป็นอัมพาต กินอาหารไม่ได้ และตายในที่สุด Avermectin สามารย่อยสลายอย่างรวดเร็วในดินโดย Photodegradation และ microbial degradation ไม่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำใต้ดินเนื่องจาก avermectin จับกับอนุภาคของดินอย่างเหนียวแน่น ถูกย่อยสลายจากจุลินทรีย์ และแสงแดด ไม่ถูกชะลงสู่แหล่งน้ำใต้ดิน (Wislocki และคณะ, 1989)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 *Streptomyces* spp.

2.3.1 ลักษณะโดยทั่วไป

Streptomyces ถูกจัดอยู่ในอันดับ (order) Actinomycetes วงศ์ (family) Streptomycetaceae สกุล (genus) *Streptomyces* (Cowan และคณะ, 1974) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ประเภทต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (aerobic) สามารถสร้างสายใย (hyphae)ได้ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-2.0 μm เส้นใยแตกแขนงได้ โดยที่ร่างแหเส้นใย ที่สร้างขึ้นจะมีลักษณะคล้ายเส้นใยของพวกรา (Brock และ Madigan, 1991) *Streptomyces* spp. มีลักษณะคล้ายเชื้อรา แต่ไม่ใช่เชื้อรา ซึ่งลักษณะที่บ่งชี้ว่า *Streptomyces* spp. เป็นแบคทีเรีย คือไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และ ไมโทคอนเดรีย นอกจากนี้ผนังเซลล์ของ *Streptomyces* sp. ยังประกอบด้วย mucopeptide (N-acetyl glucosamine เชื่อมกับ N-acetyl muramic acid); L-2,6-diamino pimelic acid; glutamic acid; glycine และ alanine (Buchanan และ Gibbons, 1974) ขณะที่ผนังเซลล์ของเชื้อราประกอบด้วย glucans, mannans และ chitin (Cummins และ Harris, 1958) การเจริญของสายใยของ *Streptomyces* มี 2 แบบ คือสายใยอาหาร (substrate หรือ vegetative mycelium) ที่เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารและฝังอยู่ในอาหารมีหน้าที่ในการดูดซึมอาหารและยึดเกาะพื้นผิว ส่วนสายใยอากาศ (aerial mycelium) เจริญเหนือผิวหน้าอาหาร มีหน้าที่ในการสร้างสปอร์เพื่อการสืบพันธุ์ (รูปที่ 2.2) ทั้งสายใยอาหาร และสายใยอากาศ สามารถผลิตรงควัตถุ (pigment)ได้หลากหลายสี และบางสายพันธุ์สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหารได้ (Noel และคณะ 1983) โคโลนีมีขนาดเล็ก 1-10 มิลลิเมตร ผิวขอบเรียบ ลักษณะเป็นปุยคล้ายผงแป้ง *Streptomyces* spp. สืบพันธุ์โดยการงอกใหม่ของ aerial spore โดยในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญ *Streptomyces* spp. จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ที่เรียกว่า โคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) ที่มีการเรียงตัวของสายสปอร์ และการแตกกิ่งที่แตกต่างกัน การสร้างสปอร์ของ *Streptomyces* เกิดจากการสร้างผนังกั้นช่องว่างภายในผนังเซลล์ของสายใยอากาศออกเป็นหลายๆเซลล์ เรียกว่า เซพตัม (septum) แล้วจึงแบ่งออกไปเป็นเซลล์แต่ละเซลล์เพื่อกลายเป็นสปอร์ต่อไป ลักษณะพิเศษของ *Streptomyces* spp. คือ สามารถผลิตสาร geosmins ซึ่งให้กลิ่นดิน และ พบอยู่จำนวนมากในดิน นอกจากนี้สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ไม่ว่าจะเป็นในปุ๋ย ตะกอนจากระบบน้ำเสีย (Nikolakopoulou และคณะ, 2005) ตะกอนดินจากทะเล (Macherla และคณะ, 2005) เมล็ดข้าวสาลี (Coombs และ Franco, 2003) หญ้าแห้ง (Dalphin และคณะ, 1991) แหล่งน้ำจืดและน้ำทะเล แต่ที่พบมากสุดคือ พบในดิน โดยเฉพาะดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารและมีความชุ่มชื้นที่พอเหมาะ (Rintala, 2003) นอกจากนี้ยังสามารถผลิต extracellular enzyme ได้เป็นจำนวนมาก และสารปฏิชีวนะกว่า 70-80% ผลิตได้จาก *Streptomyces* sp. (Kieser และคณะ, 2000) โดยมีรายงานการค้นพบอย่างต่อเนื่อง



รูปที่ 2.2 วงชีวิตของ *Streptomyces* spp.

ที่มา: http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto-E.html (25/5/2008)

วงชีวิตของ *Streptomyces* spp. เริ่มจากสปอร์งอกบนอาหารแข็ง (ขั้นที่ 1) แล้วสร้างสายใยอาหาร แพร่กระจายไปบนผิวหน้าอาหาร (ขั้นที่ 2) แล้วจึงพัฒนาสร้างเป็นสายใยอากาศ ยื่นออกจากผิวอาหาร (ขั้นที่3-4) สายใยอากาศเริ่มขดเป็นเกลียว(ขั้นที่ 5) แล้วผนังกั้นถูกแบ่งออกเป็นหลายๆ เซลล์ (ขั้นที่ 6) เพื่อสร้างเป็นสายสปอร์ (ขั้นที่ 7) แล้วหลุดออกเป็นสปอร์เดี่ยวๆ (ขั้นที่ 8) จากนั้นเข้าสู่วงจรชีวิตอีกครั้ง

2.4 สารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites)

ตามคำจำกัดความสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ คือสารที่ไม่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต หรือต่อกระบวนสร้างเซลล์ สารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิถูกสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์พวกแอคติโนแบคทีเรีย (actinobacteria), แบคทีเรียบาซิลัส (bacilli), และเชื้อรา (fungi) (Vining, 1990) เพื่อทำลายหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น สารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ มากกว่า 23,000 ชนิด ที่เป็นที่รู้จัก พบว่า ผลิตได้จากแอคติโนแบคทีเรีย 42 เปอร์เซ็นต์ ผลิตได้จากเชื้อรา 42 เปอร์เซ็นต์ และ ผลิตได้จากแบคทีเรียอื่นๆ 16 เปอร์เซ็นต์ (Lazzarini และคณะ, 2000) Streptomycetes จัดว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ โดยสารปฏิชีวนะประมาณ 10,000 ชนิดที่รู้จัก ผลิตได้จาก Streptomycetes ถึง 45-55 เปอร์เซ็นต์ (Demain, 1999, Lazzarini และคณะ, 2000) และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย (Nakano และคณะ, 2000) ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิชนิดต่างๆ ที่ผลิตได้จาก *Streptomyces* spp.

Compound	Biological activity	Species	References
Avermectin	Antiparasitic	*S. avermitillis*	Burg และคณะ (1979)
Anthracyclines	Antitumor	*S. galileus*	Fujii และ Ebizuka (1997)
Bafilomycin	ATPase-inhibitor of micro-organisms, plant and animal cells	*S. griseus*	Werner และคณะ (1984)
Chloramphennicol	Antibacterial, inhibitor of protein biosynthesis	*S. venezuelae*	Bewick และคณะ (1976)
Hygromycin	Antimicrobial, immunosuppressive	*S. hygroscopicus*	Omura และคณะ (1987) Uyeda และคณะ (2001)
Lincomycin	Antibacterial, inhibitor of protein biosynthesis	*S. lincolnensis*	Peschke และคณะ (1995)
Mitomycin C	Antitumor, binds to double- standed DNA	*S.lavendulae*	Mao และคณะ (1999)
Rapamycin	Immunosuppressive, antifungal	*S.hygroscopicus*	Vezina และคณะ (1975)
Streptomycin	Antimicrobial	*S. griseus*	Egan และคณะ (1998)
Streptozotocin	Diabetgenic	*S. achromogenes*	Herr และคณะ (1967)
Tetracyclines	antimicrobial	*S.aureofaciens*	Saleh และคณะ (1985)
		S. rimosus	Hansen และคณะ (2001)

ที่มา: Rintala (2003)

2.5 การนำมาใช้ประโยชน์

Streptomyces spp.สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นสารปฏิชีวนะและมีเป้าหมายของการออกฤทธิ์ต่อจุลชีพ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ *Streptomyces* spp. ผลิตได้ ถูกนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ด้านการแพทย์ มีการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ดังมีการรายงานโดย Ezra และคณะ(2004) พบว่า Coronamycin เป็นสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่สร้างจาก *Streptomyces* sp.(MSU-2110) มีความสามารถต้านการเจริญของ *Cryptococcus neoformans* ซึ่งเป็นราก่อโรคใน

มนุษย์ และมีฤทธิ์ในการทำลายปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย จึงสามารถผลิตเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคได้อย่างเฉพาะมากขึ้น ในปี 2006 Pereira และคณะแยก *Streptomyces tsukubaensis* ที่สามารถสร้างสาร Tacrolimus ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูที่เป็นโรคเยื่อหุ้มปลอดอักเสบได้ Taechowisan และคณะ(2007) พบว่า *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 สามารถสร้างสารต้านการอักเสบ 4 -Arylcoumarins ต่อเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในทางการแพทย์ และ ในปี 2008 Kim และ Park ทำการคัดเลือก Actinomycetes จากตัวอย่างดินในประเทศเกาหลี 127 ไอโซเลต พบ 1 ไอโซเลตคือ *Streptomyces clavuligerus* CKD1119 ที่สร้างสาร Tacrolimus ซึ่งกดภูมิคุ้มกันได้ สามารถนำไปพัฒนาทางการแพทย์เพื่อใช้ในการกดภูมิคุ้มกันในผู้เปลี่ยนถ่ายอวัยวะได้

ด้านอุตสาหกรรม ในปี 2003 Hiraki และคณะ พบว่า ε-Polylysine เป็นโฮโมพอลิเมอร์ที่ได้จากการหมักของเชื้อ *Streptomyces albulus* สามารถนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหารโดยไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค Tanabe และคณะ (2003) พบว่า *Streptomyces griseus* HUT6037 ผลิตเอนไซม์ chitosanases ซึ่งมีประโยชน์ในการเตรียม chitooligosaccharides ในอุตสาหกรรม และในปี 2008 Anisha และคณะ พบว่า *Streptomyces griseoloalbus* ผลิตเอนไซม์ galactocidases ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

ด้านปศุสัตว์ Pfaller (2006) ได้ประยุกต์ใช้ Bambermycin (flavophospholipol) ที่ผลิตได้จาก *Streptomyces* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจำพวก *Staphylococcus* spp. และ *Enterococcus faecalis* โดยใช้เติมลงไปในอาหารสัตว์เช่น วัว หมู ไก่ และไก่งวง เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต

ด้านการเกษตร *Streptomyces* สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของวัชพืชดังการศึกษาของ Schwartz และคณะ (2004) ได้ศึกษายีนจาก *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ phosphinothricin tripeptide ที่มีคุณสมบัติในการทำลายวัชพืช ในปี 2005 Sahin พบว่า *Streptomyces* 3 สายพันธุ์ คือ *S.rochei, S.ldicus* และ *S.antibioticus* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างคล้าย penicillins และมีผลยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas tolaasii* ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค bacterial blotch ในฟาร์มเห็ด ในปี 2008 Hayashi และคณะ พบว่า *Streptomyces* sp. F40 สามารถสร้างสาร Terfestatin A (Trf A) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการส่งสัญญาณของออกซิน และในปี 2008 Benimeli และคณะ พบว่า *Streptomyces* sp. M7 สามารถย่อยสลายสารฆ่าแมลงตกค้างในดินได้ถึง 68 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การงอกของเมล็ดพืชดีขึ้น และแข็งแรงมากกว่าในดินที่มี lindane ปนเปื้อน นอกจากนี้ *Streptomyces*

สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีฤทธิ์ในการกำจัดและควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยมีรายงานการค้นพบอย่างต่อเนื่อง

2.6 สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ผลิตได้จาก *Streptomyces* spp.

Burg และคณะ (1979) พบ avermectin ผลิตโดย *Strreptomyces avermitilis* สามารถฆ่า nematode และ arthropods ได้

นอกจากสารฆ่าแมลงในกลุ่ม avermectin แล้วยังมีรายงานว่า *Streptomyces hygroscopicus* สามารถผลิต milbemycin (Deshpande และคณะ, 1988) รวมทั้ง *Streptomyces nanchangesis* ก็สามารถผลิต meilingmycin (Ouyang และคณะ, 1996) ซึ่งออกฤทธิ์ฆ่าแมลงได้

Warr และคณะ(1994) พบว่า *Streptomyces hygroscopicus* RB4569D สามารถผลิต milbemycin ได้

Glazer และ Nikaido (2000) รายงานว่า *Streptomyces tendae* สามารถสร้าง nikkomycin ซึ่งสามารถฆ่าแมลงได้

Lee และคณะ (2000) ทดลองใส่ยีนควบคุม *afsR2* จาก *Streptomyce lividans* ซึ่งเป็นยีนที่มีรายงานว่าช่วยกระตุ้นการสร้างสารปฏิชีวนะหลายชนิด เข้าไปใน *Streptomyces avermitilis* พบว่ายีนดังกล่าวมีผลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต avermectin ได้สูงขึ้นจากเดิม

Lewer และคณะ (2003) พบ tartrolone C ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงชนิดใหม่ ผลิตได้จาก *Streptomycs* sp. CP1130

Xiong และคณะ (2004) แยก *Streptomyces* sp. 173 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่พบในทะเล และพบว่าสามารถผลิตสารฆ่าแมลงในกลุ่ม avermectin ได้

Engwall และคณะ (2005) ได้ทดลองสังเคราะห์ DNA ของยีน *ave C* ใส่เข้าไปในเชื้อ *Streptomyces avermitilis* เพื่อเพิ่มการผลิต doramectin ให้มีปริมาณมากขึ้นในภาคอุตสาหกรรม

Zhang และคณะ (2006) สามารถตัดต่อยีน *Olm* จากเชื้อ *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439 ใส่เข้าไปใน *Streptomyces avermitilis* Olm 73-12 เพื่อผลิต ivermectin ได้แทนการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งมีต้นทุนสูง

Yin และคณะ (2008) ศึกษาผลของปริมาณของไนโตรเจนเริ่มต้น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร ต่อลักษณะการเจริญของเส้นใยของ *Streptomyces avermitilis* ในการผลิตสาร avermectin ในถังหมัก ขนาด 50 ลิตร พบว่า ที่ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้น 4.3 เปอร์เซ็นต์ เส้นใยมีลักษณะการเจริญแบบ pellet ที่มีขนาดเล็ก และลักษณะเส้นใยแบบ pellet นี้จะช่วยในการส่งผ่านออกซิเจนเข้าภายในเซลล์ได้ดี ทำให้ได้ avermectin ในปริมาณสูง

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Streptomyces* ชนิดต่างๆ ได้มีการรายงานการใช้แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนหลากหลายชนิด รวมทั้งภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อก็แตกต่างกันตามความเหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดดังนี้

Xiong และคณะ (2004) เลี้ยง *Streptomyces* sp.173 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งที่ละลายน้ำได้ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และมีเพบโทน 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มเชื้อที่ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่าให้สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพสูง เมื่อทดสอบกับไรทะเล โดยให้เปอร์เซ็นต์การตาย 100 เปอร์เซ็นต์ที่เวลาทดสอบ 1 ชั่วโมง

Gesheva และคณะ (2005) เลี้ยง *Streptomyces hygroscopicus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแลกโตส 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซักซิเนต 0.15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่ 31.7 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบ/นาที เป็นเวลา 144 ชั่วโมง พบว่าผลิต AK-111-81 macrolide antibiotic ได้สูงถึง 17.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน

Sujatha และคณะ (2005) เลี้ยง *Streptomyces psammoticus* BT-408 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคส 1.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และมี NH_4NO_3 0.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบ/นาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าผลิตสารปฏิชีวนะ SBR-22 ต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้เพิ่มสูงขึ้น 1.82 เท่า

Zhuang และคณะ (2006) ศึกษาผลของแหล่งอาหารเพื่อเพิ่มผลผลิต meilingmycin โดย *Streptomyces nanchangensis* พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย corn flour 43.6 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ maize starch 35.9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และมีกากถั่วเหลือง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยมี KNO_3 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่ง

ไนโตรเจน บ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่าให้ meilingmycin เพิ่มขึ้นจาก 51.3 เป็น 228.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Wu และคณะ (2008) เลี้ยง *Streptomyces padanus* PMS-702 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคส 1.12 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน กากถั่วเหลือง 1.12 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.5 และบ่มที่ 31.7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พบว่าให้ fungichromin ถึง 112 มิลลิกรัมต่อลิตร

Yu และคณะ (2008) เลี้ยง *Streptomyces rimosus* MY02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย แป้ง 5.33 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน defatted peanut powder 0.94 เปอร์เซ็นต์ และ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.62 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6 และบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่า ให้สารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Fusarium oxysporium* f sp. *cucumarinum* โดยให้ inhibition zone มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 33.19 มิลลิเมตร เมื่อทดสอบเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

Liang และคณะ (2008) เลี้ยง *Streptomyces gilvosporeus* LK-196 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้าง natamycin โดยใช้กลูโคส 6.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้กากถั่วเหลือง, เพบโทน, สารสกัดจากยีสต์ และ สารสกัดจากเนื้อ 1.0, 0.5, 0.5 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.0-7.2 และบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิต natamycin ได้สูงถึง 2.03 กรัมต่อลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (electronic balance) รุ่น FX-3000 ของบริษัท A&D ประเทศญี่ปุ่น

2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (electronic balance) รุ่น FX-180 ของบริษัท A&D ประเทศญี่ปุ่น

3. เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota Corporation ประเทศญี่ปุ่น

5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge) รุ่น TOMY MC-15A ของบริษัท TOMY SEIKO ประเทศญี่ปุ่น

6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น MV Spectronic 21 ของบริษัท BAUSCH&LOMB ประเทศญี่ปุ่น

7. ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ของบริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น

8. เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (rotary incubator shaker) รุ่น G-25 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

9. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น HV-50 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น

10. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) ของบริษัท International Scientific Supply ประเทศไทย

11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น TE-8D ยี่ห้อ Tempette ของบริษัท Techne ประเทศอังกฤษ

12. Ultrasonic disruption รุ่น UD-201 ของบริษัท Tomy Seiko Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

13. เตาอบไมโครเวฟ (Microwave oven) รุ่น NE-767C ของบริษัท Matsushita Electric Industrial ประเทศญี่ปุ่น

14.ปั๊ม (Pump) รุ่น MPN125ของบริษัท Thakita Electric Works., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

15. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน รุ่น Buchi 345 Distillation unit และ รุ่น Buchi 345 Digestor ของบริษัท Buchi Labortory Techniques Ltd., ประเทศสวิตเซอร์แลน

16. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น CHS ของบริษัท Olympus Optical ประเทศญี่ปุ่น

17. เครื่อง HPLC (High performance Liquid Chromatography) ของบริษัท Thermo Finnigan ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ประกอบด้วย

Pump ของบริษัท Thermo Finnigan ประเทศสหรัฐอเมริกา

UV detector model UV6000LP ของบริษัท Thermo Finnigan ประเทศสหรัฐอเมริกา

Autosampler model AS3000 ของบริษัท Thermo Finnigan ประเทศสหรัฐอเมริกา

HPLC column: RP-C18 (250 x 4.9 nm, I.D. 5 μm) ของบริษัท Phenomenex ประเทศสหรัฐอเมริกา

18. PTFE Microfilter ขนาดรูพรุน 0.45 μm ของบริษัท Sartorius ประเทศเยอรมัน

19. Vials พร้อมฝา ขนาด 1.8 ml ของบริษัท Thermo Finnigan ประเทศสหรัฐอเมริกา

20. เครื่องกวนควบคุมอุณหภูมิ (hot plate stirrer) รุ่น HS-115 บริษัท หริกุล กรุ๊ป จำกัด ประเทศไทย

21. เครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) รุ่น N-1000 ของบริษัท EYELA ประเทศญี่ปุ่น

22. High Speed Micro Refrigerated Centrifuge รุ่น MTX-150 บริษัท Tomy ประเทศญี่ปุ่น

3.2 เคมีภัณฑ์	**บริษัท**	**ประเทศ**
Agar (วุ้นผงตรานางเงือก)	พัฒนสินเอนเตอร์ไพรส์	ไทย
Albumin from bovine serum (BSA)	Sigma	Germany
Boric acid (H_3BO_3)	Merck	Germany
Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)	Fluka	Switzerland
Dinitrosalicylic acid	Sigma	U.S.A
Ethanol absolute 99.5%	Merck	Germany
Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Folin-phenol)	Fluka	Switzerland
Glucose (Dextrose)	สยามชัย เคมิคอล	ไทย
Hydrochloric acid (HCl)	Merck	Germany
Peptone	Difco	U.S.A
Potassium sodium tartrate	Carlo Erba	Italy
Sodium chloride (NaCl)	Merck	Germany
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck	Germany
Yeast extract	Difco	U.S.A
Acetronitrile, HPLC grade	Merck	Germany
Methanol, HPLC grade	Merck	Germany

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เคมีภัณฑ์	บริษัท	ประเทศ
Dextrin	Wako Pure Chemical Industries, LTD	Japan
Ammonium chloride (NH_4Cl)	Fluka	Switzerland
Ethanol	กรมสรรพสามิต	ไทย
Ethyl acetate	Merck	Germany
แป้งมันสำปะหลังตราปลาไทย 5 ดาว	อี.ที.ซี เอี๊ยบตงจั่น จำกัด	ไทย
แป้งข้าวโพดตราคนอร์	ยูนิลิเวอร์ ไทย เทรดดิ้ง จำกัด	ไทย
น้ำตาลทรายมิตรผล	น้ำตาลมิตรผล	ไทย
ไรทะเล	INVE (Thailand) LTD.	ไทย
TLC aluminium sheet	Merck	Germany
Alpha-amylase (BAN 480®L)	Novo	Denmark
Avermectin B	Merck	Germany
Doramectin	Merck	Germany
Ivermectin	Merck	Germany

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงเบื้องต้นของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ในอาหารวุ้นแข็ง และการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อทดสอบ

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 บนอาหารวุ้นแข็งสูตรดัดแปลงจาก Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตัดวุ้นให้มีขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สับให้ละเอียด จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปราศจากเชื้อ 0.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสกัดสารจากเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารสกัดส่วนใส เก็บไว้สำหรับทดสอบต่อไป

3.3.2 การเลี้ยงและการทดสอบสารออกฤทธิ์ต่อไรทะเล (Brine shrimp) (Xiong และคณะ, 2004)

3.3.2.1. การเตรียมไรทะเล

3.3.2.1.1 ใส่ไข่ไรทะเล (*Artemia salina*) 2.5 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร โดยน้ำที่ใช้ฟักไรทะเลมีสัดส่วนของน้ำกลั่นต่อน้ำทะเลเป็น 2:1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งให้อากาศและแสงสว่างในภาชนะรูปกรวยคว่ำ (ภาคผนวก จ หมายเลข 2) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2.1.2 ดูดตัวอ่อน (nauplii) เก็บในภาชนะที่เหมาะสม โดยปิเปตในชั้นกลางของน้ำทะเล (ซึ่งเป็นบริเวณที่มีตัวอ่อน)

3.3.2.2 การทดสอบสารฆ่าแมลงกับไรทะเล

ดูดไรทะเล 200 ไมโครลิตร ที่มีตัวอ่อน (nauplii) 9-15 ตัว ใส่ในถาดหลุมขนาด 96 หลุม (96-well tissue culture plate) เติมสารตัวอย่างจาก *Streptomyces* spp. ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยใช้สารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นชุดควบคุม ตรวจดูผลการตายของตัวอ่อน (nauplii) เทียบกับชุดควบคุม ที่ระยะเวลาต่างๆ ภายใน 24 ชั่วโมง ส่องภายใต้กล้องและบันทึกผลดังนี้

เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล = $\frac{\text{จำนวนไรทะเลที่ตาย หรือหยุดว่ายน้ำ}}{\text{จำนวนทั้งหมดของไรทะเล}} \times 100$

3.3.3 การเลี้ยง *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

3.3.3.1 การเตรียมสปอร์ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

ปลูกเชื้อ สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ในอาหารวุ้นแข็งเอียง (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จนกระทั่งสปอร์แก่เต็มที่ แล้วจึงนำมาขูดสปอร์ออกโดยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวแขวนลอย ดูดสปอร์แขวนลอยที่ได้มากรองผ่านชุดกรองสปอร์ (ภาคผนวก จ หมายเลข 1) นำสปอร์แขวนลอยที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยใน 20 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยเจือจางให้ได้ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับสายพันธุ์ 442 และ 449 และ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับสายพันธุ์ O145702 แบ่งเก็บเป็นปริมาตรน้อยๆ (aliquots) ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.3.2 การเลี้ยง *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ในอาหารเหลว

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ สายพันธุ์ 442 และ 449 ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับสายพันธุ์ O145702 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปสกัดสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

3.3.4 การสกัดสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

3.3.4.1 นำเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ 3.3.3.2 มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนเส้นใย (Mycelium) และส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (Broth)

3.3.4.2 นำส่วนเส้นใยสกัดด้วยเอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมเป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง

3.3.4.3 นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง

สำหรับชุดควบคุม คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการเลี้ยงเชื้อ แล้วนำมาสกัดวิธีเดียวกับข้างต้น ข้อ 3.3.4.1 และ 3.3.4.3

3.3.4.4 ทิ้งให้สารแยกชั้น แล้วจึงนำชั้นเอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนระเหยแห้งหมด ชั่งน้ำหนักสาร แล้วละลายด้วยเอทานอล 30 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร โดยเติมน้ำขจัดไอออน (deionized water) จากนั้นเจือจางด้วยน้ำขจัดไอออนให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นในช่วง 10 ถึง 100 ppm เพื่อนำไปทดสอบหาประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเล (ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบกับไรทะเลจะเท่ากับใช้สารเข้มข้นในช่วง 5 ถึง 50 ppm)

3.3.5 การศึกษาผลของกลูโคสต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของสายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ในอาหารเหลว

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ สายพันธุ์ 442 และ 449 ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับสายพันธุ์ O145702 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยง 18 ชั่วโมง สำหรับสายพันธุ์ 442 และ 449 และ 30 ชั่วโมง สำหรับสายพันธุ์ O145702 จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยแปรความเข้มข้นของกลูโคสที่ 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นแบ่ง culture มาปริมาตร 20-25 มิลลิลิตรไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) ตามข้อ 3.3.4 แล้วนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงกับไรทะเลตามข้อ 3.3.2 และนำอีก 5 มิลลิลิตรไปหาการเจริญของเซลล์ โดยการปั่นแยกเซลล์และล้างน้ำ 2 ครั้งแล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยความถี่ของคลื่นเสียง (ภาคผนวก ค หมายเลข 6) จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากเซลล์โดยวิธี Lowry (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.6 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

3.3.6.1 การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ที่ใช้แทนกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB มีดังนี้ น้ำตาลทราย (sucrose) เดกซ์ทริน (dextrin) แป้งที่ละลายน้ำได้ (soluble starch) แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) แป้งข้าวโพด (corn starch) และแป้งมันที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ข หมายเลข 1 สำหรับสายพันธุ์ O145702) โดยใช้ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นแบ่ง culture มาปริมาตร 20-25 มิลลิลิตร ไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) ตามข้อ 3.3.4 แล้วนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงกับไรทะเลตามข้อ 3.3.2 และนำอีก 5 มิลลิลิตรไปหาการเจริญของเซลล์ โดยการปั่นแยกเซลล์และล้างน้ำ 2 ครั้งแล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยความถี่ของคลื่นเสียง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากเซลล์โดยวิธี Lowry

3.3.6.2 หาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ สายพันธุ์ 442 และ 449 ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับสายพันธุ์ O145702 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.1 มาแปรความเข้มข้นที่ 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นแบ่ง culture มาประมาณ 20-25 มิลลิลิตรไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) ตามข้อ 3.3.4 แล้วนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงกับไรทะเลตามข้อ 3.3.2 และนำอีก 5 มิลลิลิตรไปหาการเจริญของเซลล์ โดยการปั่นแยกเซลล์ออกจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อโดยนำเซลล์ล้างน้ำ 2 ครั้งแล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยความถี่ของคลื่นเสียง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากเซลล์โดยวิธี Lowry ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี DNSA (ภาคผนวก ค หมายเลข 3)

3.3.6.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ สายพันธุ์ 442 และ 449 ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับสายพันธุ์ O145702 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.2 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นแบ่ง culture มาประมาณ 20-25 มิลลิลิตรไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) ตามข้อ 3.3.4 แล้วนำไป

ทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงกับไรทะเลตามข้อ 3.3.2 และนำอีก 5 มิลลิลิตรไปหาการเจริญของเซลล์ โดยการปั่นแยกเซลล์ออกจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อโดยนำเซลล์ล้างน้ำ 2 ครั้งแล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยความถี่ของคลื่นเสียง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากเซลล์โดยวิธี Lowry ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี DNSA

3.3.7 ปริมาณอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp.

3.3.7.1 การหาชนิดของอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ดัดแปลงคือ yeast extract และโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ซึ่งเป็นอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนตามลำดับ จากการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl (ภาคผนวก ค หมายเลข 4) พบว่า yeast extract มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 10.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และโพแทสเซียมไนเตรทมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 17.29 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เมื่อคำนวณจากสูตรโมเลกุล โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ดัดแปลง ใช้ yeast extract 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จึงมีปริมาณไนโตรเจนจาก yeast extract อยู่ 0.0217 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และใช้โพแทสเซียมไนเตรท 0.38 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนอยู่ 0.0527 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังนั้นปริมาณไนโตรเจนรวมในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ดัดแปลงเท่ากับ 0.0744 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

แหล่งอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นำมาทดสอบได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ เพบโทน แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) และโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยถ่ายสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์ 442 และ 449 ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับสายพันธุ์ O145702 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.3 นำมาแปรแหล่งอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นำมาใช้ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์, เพบโทน, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$ และ KNO_3 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.0744 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นแบ่ง culture มาประมาณ 20-25 มิลลิลิตรไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) ตามข้อ 3.3.4 แล้วนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงกับไรทะเลตามข้อ 3.3.2 และนำอีก 5 มิลลิลิตรไปหาการเจริญของเซลล์ โดย

การปั่นแยกเซลล์นำเซลล์ล้างน้ำ 2 ครั้งแล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยความถี่ของคลื่นเสียง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากเซลล์โดยวิธี Lowry

3.3.7.2 การหาความเข้มข้นของอินทรีย์หรืออนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์ 442 และ 449 ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับสายพันธุ์ O145702 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนและอินทรีย์หรืออนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.7.1 โดยนำอินทรีย์หรืออนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมมาแปรความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนที่ 0.025, 0.05, 0.075, และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นแบ่ง culture มาประมาณ 20-25 มิลลิลิตรไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) ตามข้อ 3.3.4 แล้วนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงกับไรทะเลตามข้อ 3.3.2 และนำอีก 5 มิลลิลิตรไปหาการเจริญของเซลล์ โดยการปั่นแยกเซลล์ออกจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อโดยนำเซลล์ล้างน้ำ 2 ครั้งแล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยความถี่ของคลื่นเสียง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากเซลล์โดยวิธี Lowry

3.3.7.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงเมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์ 442 และ 449 ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับสายพันธุ์ O145702 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนและอินทรีย์หรืออนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.7.2 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรระยะเวลาบ่มเชื้อ 1-7 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นแบ่ง culture มาประมาณ 20-25 มิลลิลิตรไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) ตามข้อ 3.3.4 แล้วนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงกับไรทะเลตามข้อ 3.3.2 และนำอีก 5 มิลลิลิตรไปหาการเจริญของเซลล์ โดยการปั่นแยกเซลล์ออกจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อโดยนำเซลล์ล้างน้ำ 2 ครั้งแล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยความถี่ของคลื่นเสียง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากเซลล์โดยวิธี Lowry ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อนำมาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Kjeldahl

3.3.8 อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ สายพันธุ์ 442 และ 449 ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับสายพันธุ์ O145702 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายในบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยง 18 ชั่วโมง สำหรับสายพันธุ์ 442 และ 449 และ 30 ชั่วโมง สำหรับสายพันธุ์ O145702 จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อคือ 28, 30 และ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0-7 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันติดตามการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

เลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในข้อ 3.3.7.3 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 250 รอบ โดยแปรระยะเวลาบ่มเชื้อ 0-7 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดด้วย เอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) ตามข้อ 3.3.4 นำไปทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงกับไรทะเลตามข้อ 3.3.2

3.3.9 การหาความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ทำให้ ไรทะเลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนเริ่มต้น (LD_{50}) (Martins และคณะ, 2007)

ดูดไรทะเลมา 200 ไมโครลิตร ให้มีตัวอ่อน (nauplii) 9-15 ตัว ใส่ในถาดหลุมขนาด 96 หลุม (96-well tissue culture plate) เติมสารทดสอบ 200 ไมโครลิตรที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ลงไปในแต่ละหลุม ทำการทดลอง 5 ซ้ำการทดลอง โดยใช้สารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นชุดควบคุม ตรวจดูผลการตายของตัวอ่อน (nauplii) เทียบกับชุดควบคุม

3.3.10 การแยกสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสารสกัดหยาบโดยวิธีโครมาโทกราฟี (chromatography)

3.3.10.1 แยกสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสารสกัดหยาบโดยวิธีทินแลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (Preparative Thin Layer chromatography)

โดยการลากเป็นแถบของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสารสกัดหยาบโดยมีน้ำหนักสารประมาณ 35-50 มิลลิกรัมที่ละลายในเอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) ลงบนแผ่นซิลิกาเจล (silica gel 60 F254, E. Merck, Germany) ที่มีความหนา 1.0 มิลลิเมตร กว้าง 20 เซนติเมตร และยาว 20 เซนติเมตร นำแผ่นใส่ลงในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยสารละลายเอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) โดยให้ส่วนปลายฐานของแผ่นแช่อยู่ในตัวทำละลายสูงประมาณ ¾ นิ้ว เมื่อสารละลายซึมมาถึงตำแหน่งที่ห่าง

จากปลายบนประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำมาทำให้แห้ง นำมาส่องภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ใช้ดินสอลากเส้นแต่ละแถบที่ปรากฏ จากนั้นใช้มีดขูดแต่ละแถบใส่ในหลอดทดลอง นำไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) ระเหยแห้ง แล้วนำสารสกัดที่ได้จากแต่ละแถบทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเล และนำไปวิเคราะห์โดย analytical TLC และ High performance liquid chromatography

3.3.10.2 การวิเคราะห์โดย Analytical Thin Layer chromatography

3.3.10.2.1 การเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

หยดสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่แยกได้จาก Preparative TLC ซึ่งละลายใน เอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) ลงบนแผ่นซิลิกาเจล (silica gel 60 F254, E. Merck, Germany) ที่มีความหนา 0.25 มิลลิเมตร กว้าง 5.0 เซนติเมตร และยาว 7 เซนติเมตร นำแต่ละแผ่นใส่ลงในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยสารละลาย โดยให้ส่วนปลายฐานของแผ่นแช่อยู่ในตัวทำละลายสูงประมาณ ¾ นิ้ว แปรชนิดของ mobile phase ดังนี้

ก. เอทิลอะซิเทต (ethyl acetate)

ข. 20% เมทานอล (methanol) : 80% เอทิลอะซิเทต (ethyl acetate)

ค. 15% เมทานอล (methanol) : 85% เอทิลอะซิเทต (ethyl acetate)

ง. 10% เมทานอล (methanol) : 90% เอทิลอะซิเทต (ethyl acetate)

เมื่อสารละลายซึมมาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบนประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำมาทำให้แห้ง นำมาตรวจสอบโดยส่องภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากนั้นนำแผ่นซิลิกามาพ่นด้วย 10% กรดซัลฟูลิกในเอทานอล แล้วนำมาให้ความร้อนบน hot plate จนเห็นแถบสาร หาค่า R_f เทียบกับสารมาตรฐาน avermectin

3.3.10.3 การแยกสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง โดย High performance liquid chromatography (HPLC)

3.3.10.3.1 การเตรียมสารฆ่าแมลงมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานได้แก่ avermectin, doramectin และ ivermectin ละลายในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 100 ppm นำมากรองผ่าน PTFE microfilter ขนาดรูพรุน 0.45 µm ใส่ vial ขนาด 1.5 mL

3.3.10.3.2 การเตรียมสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่แยกได้จาก Preparative TLC จากสายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

ละลายสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 100 ppm นำมากรองผ่าน PTFE microfilter ขนาดรูพรุน 0.45 µm ใส่ vial ขนาด 1.5 mL

3.3.10.3.3 สภาวะที่ใช้วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC

ทำการวิเคราะห์สารฆ่าแมลงมาตรฐาน และสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่แยกได้จาก Preparative TLC โดย HPLC ตามวิธีการของ Seelanan และคณะ (2006)

Column : Phenomenex® RP-C_{18}, 250 x 4.9 nm, 5 µm

Mobile phase : Methanol/ DDI water/Acetonitrile (Gradient Elution) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

Flow rate : 1.0 mL/min

Injection volume : 10 µL

Detection : UV 254 nm

ตารางที่ 3.1 Gradient Elution

เวลา (นาที)	MeOH(%)	DDI water (%)	Acetonitrile(%)
0	0	40	60
40	30	10	60
50	0	10	90
51	0	40	60
60	0	40	60

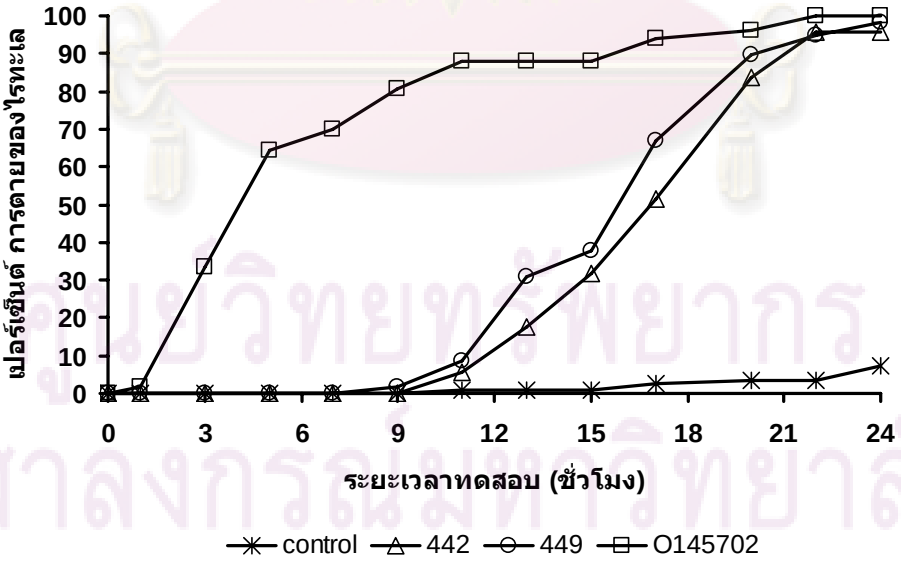
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารวุ้นแข็ง

จากรายงานการคัดกรอง *Streptomyces* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทยโดย Sujitwanit และคณะ (2007) พบว่าสายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงได้เมื่อทดสอบกับไรทะเล การทดลองนี้จะทดสอบเพื่อยืนยันว่า *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ยังคงสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลได้ โดยทำการเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะตามวิธีการข้อ 3.3.1 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 สามารถฆ่าไรทะเลได้เมื่อบ่มกับไรทะเลเป็นเวลาตั้งแต่ชั่วโมงที่ 11, 9 และ 1 ตามลำดับ โดยให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น และให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลสูงสุดถึง 95.92, 98.45 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 22, 24 และ 22 ชั่วโมง ตามลำดับ เทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้สารสกัดหยาบจากอาหารวุ้นแข็งปราศจากเชื้อ (Control) ซึ่งไม่พบการตายของไรทะเลตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-9 แต่ที่ชั่วโมงที่ 11-24 พบการตายของไรทะเลเล็กน้อยประมาณ 0.77-7.28 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มเป็นเวลา 15-24 ชั่วโมง



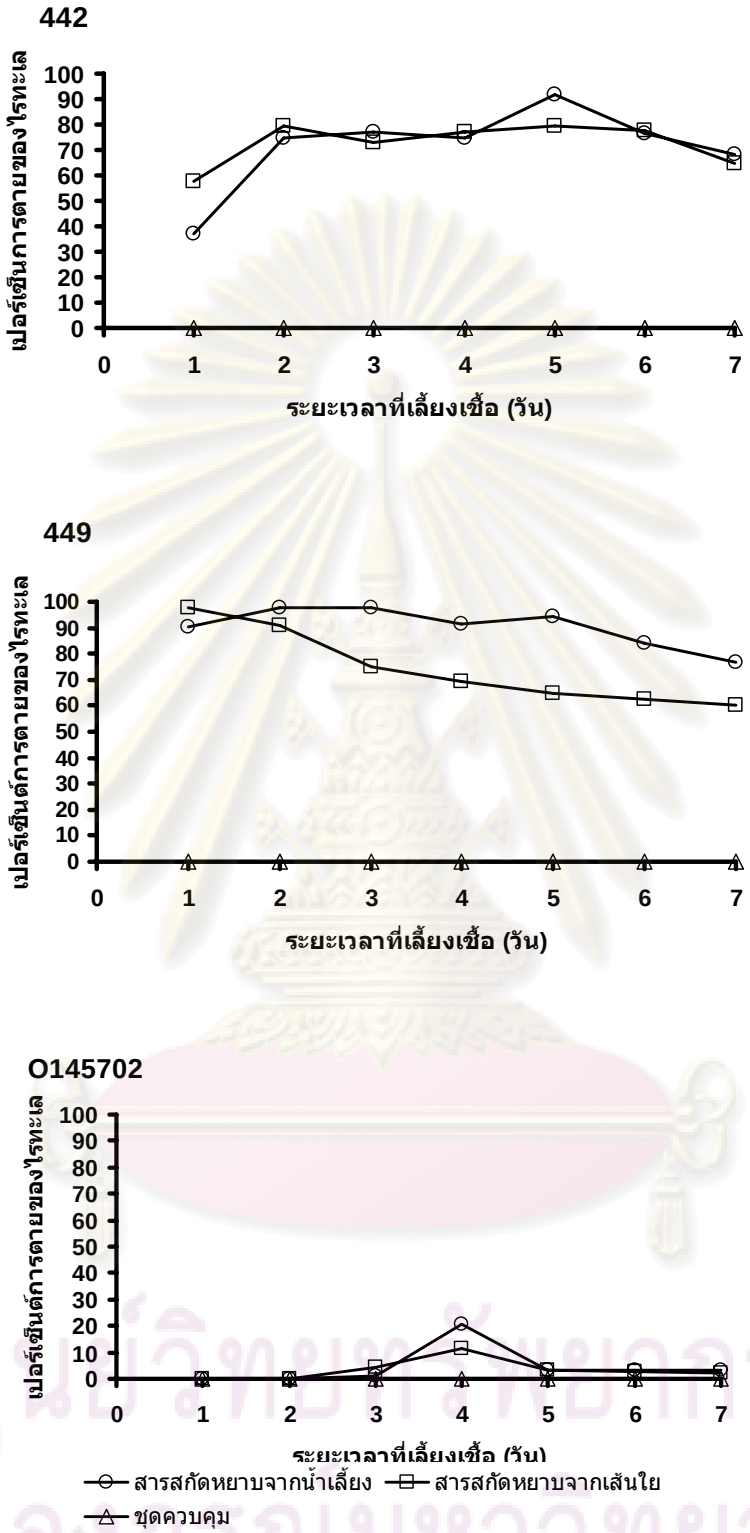
รูปที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 บนอาหารวุ้นแข็งสูตรดัดแปลงจาก LB ที่เวลาต่างๆ

4.2 การตรวจสอบแหล่งสะสมสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ในอาหารเหลว

การทดลองนี้เพื่อตรวจสอบว่าสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจาก *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 สร้างขึ้นเป็นชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ (extracellular substance) หรือเก็บไว้ในเซลล์ (intracellular substance) โดยทำการเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะตามวิธีการในข้อ 3.3.3.2 จากนั้นแยกส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อและเซลล์ไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเทตแล้วนำมาทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลตามวิธีการในข้อ 3.3.2 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากทั้งส่วนเส้นใยและส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm สามารถออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลได้ เมื่อบ่มกับไรทะเลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงสร้างจาก *Streptomyces* spp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์และปล่อยออกมานอกเซลล์ โดยยังมีบางส่วนสะสมอยู่ภายในเซลล์ โดยพบว่าให้ฤทธิ์ฆ่าไรทะเลสูงใกล้เคียงกับที่ปล่อยออกนอกเซลล์

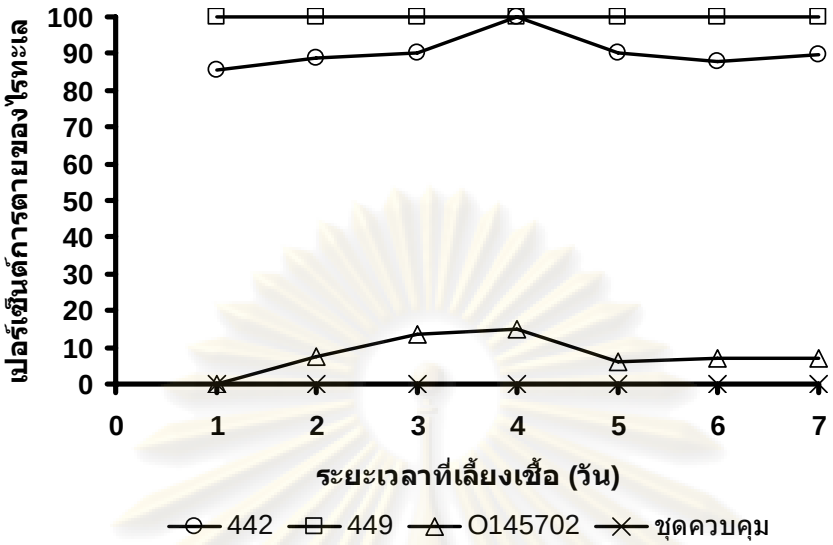
จากข้อมูลที่ได้ข้างต้น ดังนั้นการสกัดสารออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลจาก *Streptomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในการทดลองต่อๆไปจะสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยทั้งหมด (whole culture) ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.3 ได้ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยทั้งหมด ของ *Streptomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงใน LB สูตรดัดแปลงที่ใช้ KNO_3 0.38 เปอร์เซ็นต์ แทนเพบโทน และมีกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สายพันธุ์ 442 และ 449 สามารถฆ่าไรทะเลได้ดี โดยให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลสูงสุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ทั้งคู่ เทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่พบการตายของไรทะเล เมื่อบ่มกับไรทะเลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่สายพันธุ์ O145702 ให้สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงมีประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลต่ำ โดยให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด 15.15 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล บ่ม 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบเข้มข้น 50 ppm จากเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว สูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

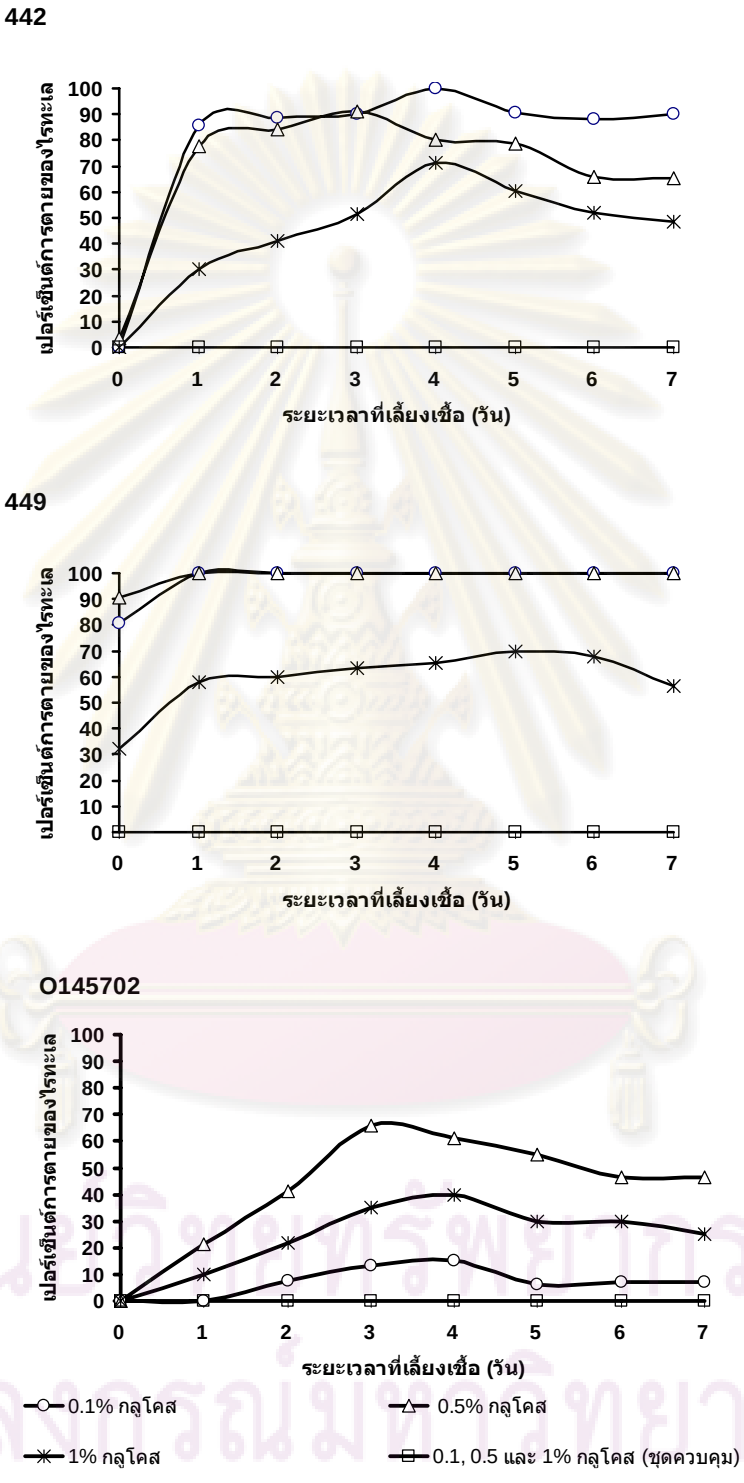


รูปที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล บ่ม 24 ชั่วโมงเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบเข้มข้น 50 ppm จาก *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

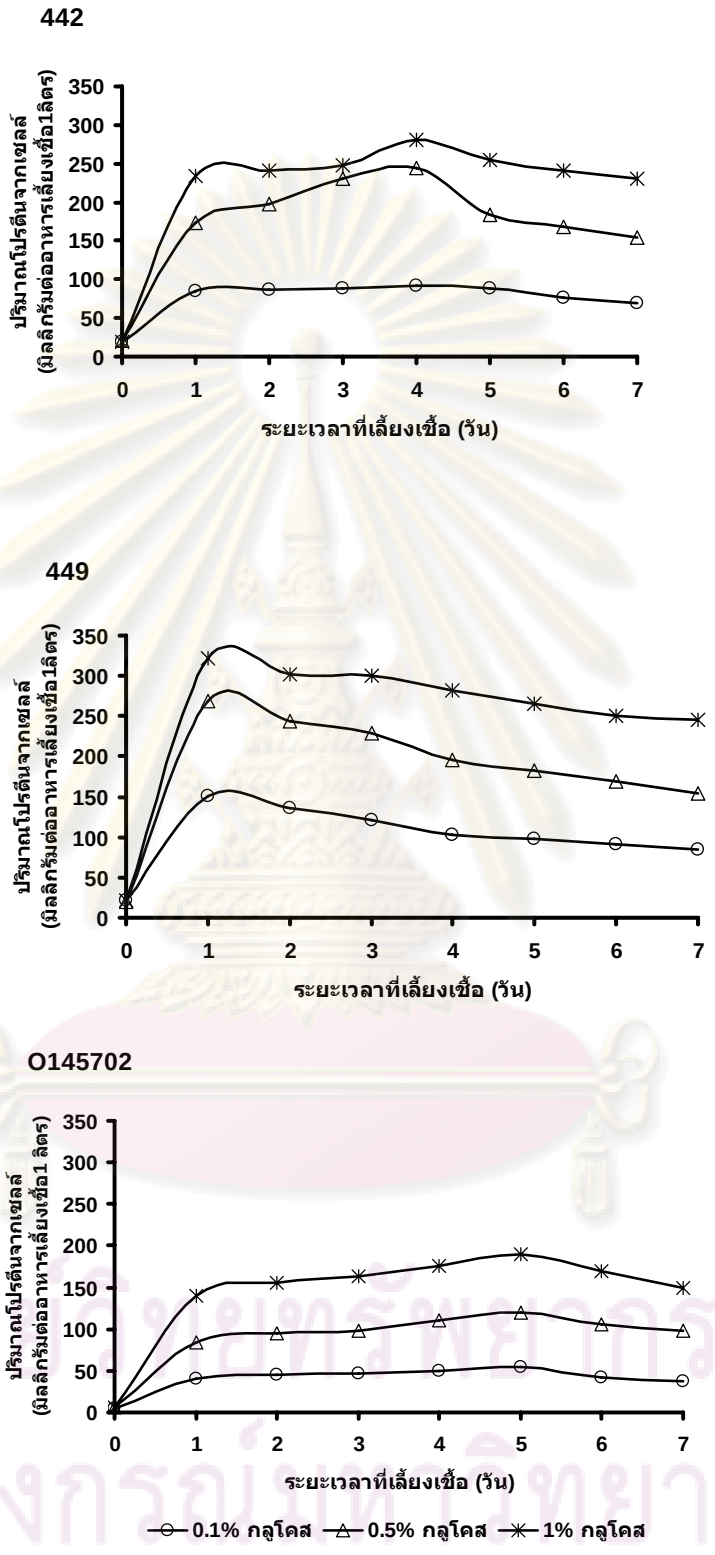
4.3 ผลของความเข้มข้นกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงและการเจริญของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

จากการแปรความเข้มข้นของกลูโคสที่ 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอาหารสูตรดัดแปลงจาก LB ผลการทดลองในรูปที่ 4.4 พบว่าสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสายพันธุ์ 449 ให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นกลูโคส 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อใช้ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขณะที่เมื่อความเข้มข้นกลูโคสเพิ่มขึ้นเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ กลับให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลลดลง ซึ่งสายพันธุ์ 442 ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน สำหรับสายพันธุ์ O145702 พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในกลูโคส 0.1 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ อาจเนื่องจากว่าปริมาณกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีปริมาณไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ ในขณะที่เมื่อทำการเพิ่มกลูโคสเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) กลับมีผลเพิ่มการเจริญมากกว่าการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งสอดคล้องกับ Gallo และ Katz (1972) พบว่ากลูโคสยับยั้งการสร้างสาร phenoxazinone และ actinomycin และ Inoue (2007) พบว่า กลูโคสยับยั้งการผลิตสาร retamycin จากการทดลองจะเห็นว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะแปรชนิดของแหล่ง

คาร์บอนอื่นๆ ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับกลูโคสในการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง



รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นกลูโคสต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ทดสอบที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นกลูโคสต่อการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

4.4.1 การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

จากการทดลองแปรแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่น้ำตาลทราย (sucrose), เดกซ์ทริน (dextrin), แป้งที่ละลายน้ำได้ (soluble starch), แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) และ แป้งข้าวโพด (corn starch) แทนการใช้กลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB โดยใช้ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน พบว่า แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพด เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง โดยสายพันธุ์ 449 ให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลเท่ากับ 90.48 และ 89.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าการตายของไรทะเลสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในกลูโคส เมื่อทำการบ่มกับไรทะเลเป็นเวลาเพียง 3 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm และพบว่าสารออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลที่ได้จากสายพันธุ์ 449 จากทุกแหล่งคาร์บอน สามารถฆ่าไรทะเลได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มสารออกฤทธิ์ 50 ppm กับไรทะเลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขณะที่แป้งข้าวโพด และเดกซ์ทริน เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด สำหรับสายพันธุ์ 442 และ O145702 ตามลำดับ โดยให้เปอร์เซ็นการตายของไรทะเล 88.51 และ 72.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในกลูโคส ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเล ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm ของเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB เป็นเวลา 3 วัน

แหล่งคาร์บอน	เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล			
	449[1]	449[2]	442[2]	O145702[2]
กลูโคส	76.72 ± 8.12	100 ± 0.00	80.30 ± 11.30	58.95 ± 11.25
น้ำตาลทราย	66.98 ± 6.23	100 ± 0.00	80.28 ±12.63	24.70 ± 7.71
เด็กตริน	79.23 ± 6.31	100 ± 0.00	77.93 ± 11.70	72.42 ± 14.71
แป้งที่ละลายน้ำได้	85.78 ± 8.46	100 ± 0.00	84.22 ± 9.42	44.99 ± 16.79
แป้งมันสำปะหลัง	90.48 ± 8.53	100 ± 0.00	79.40 ± 11.77	19.16 ± 9.68
แป้งข้าวโพด	89.25 ± 5.37	100 ± 0.00	88.51 ± 10.09	7.95 ± 1.03

หมายเหตุ 1. บ่มกับไรทะเลเป็นเวลา 3 ชั่วโมง 2. บ่มกับไรทะเลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

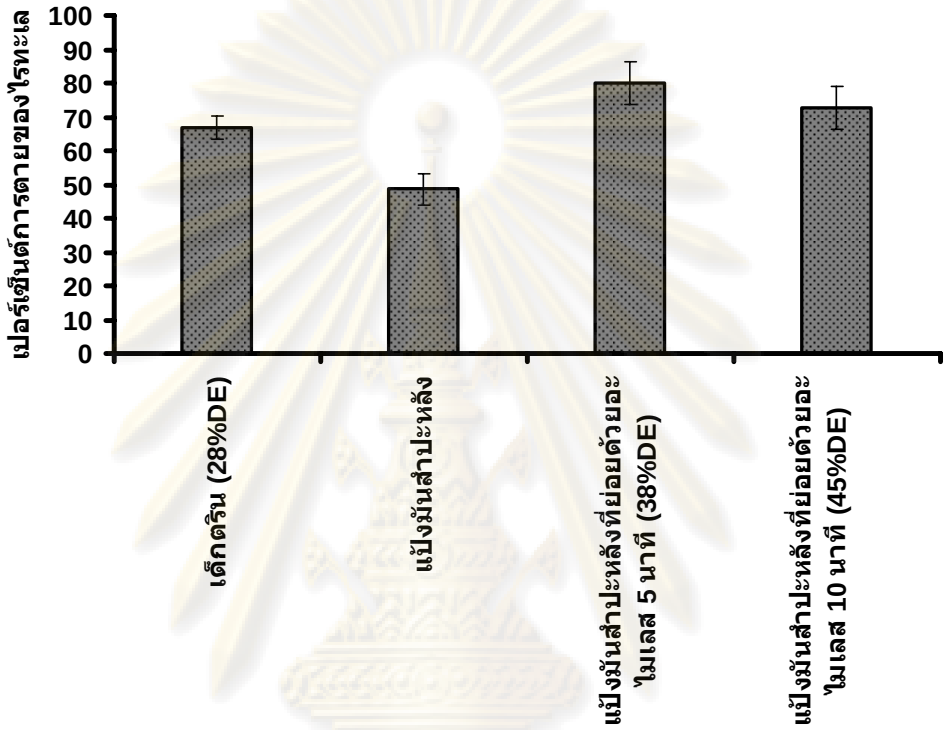
จากผลการทดลองในตารางที่ 4.1 บ่งชี้ว่าสายพันธุ์ 442 และ 449 สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยแป้งให้เป็นโมเลกุลเล็กแล้วนำมาใช้ในการเจริญของเชื้อได้ ดังนั้นจึงได้เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียง (ภาคผนวก ค หมายเลข 6) แล้ววิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากเซลล์ (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) เมื่อพิจารณาจากการเจริญของเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดเป็นส่วนประกอบ พบว่าเชื้อมีการเจริญดีและมีการเจริญสูงกว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ในขณะที่การเจริญของสายพันธุ์ O145702 ที่เลี้ยงในแป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดมีการเจริญที่ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในกลูโคส และประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในกลูโคสเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.2 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการเจริญของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB เป็นเวลา 3 วัน

แหล่งคาร์บอน	โปรตีนจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)		
	449	442	O145702
กลูโคส	230.55 ± 2.21	225.60 ± 3.83	134.38 ± 2.21
น้ำตาลทราย	177.43 ± 4.42	222.48 ± 5.85	142.19 ± 2.21
เด็กตริน	225.55 ± 3.83	217.79 ± 2.21	154.69 ± 3.83
แป้งที่ละลายน้ำได้	372.74 ± 3.83	256.85 ± 5.85	117.19 ± 3.83
แป้งมันสำปะหลัง	269.61 ± 3.83	251.00 ± 3.83	101.56 ± 2.21
แป้งข้าวโพด	308.68 ± 2.21	233.41 ± 2.21	92.19 ± 2.21

ในการทดลองขั้นต่อไปจะเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสายพันธุ์ 442 และ 449 ส่วนสายพันธุ์ O145702 พบว่าเดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด แต่เนื่องจากเดกซ์ทรินมีราคาสูง จึงได้ทดลองใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งให้ค่า DE 38 % และ 10 นาที ซึ่งให้ค่า DE 45 % เปรียบเทียบกับการใช้เดกซ์ตรินซึ่งวิเคราะห์ค่า DE ได้ 28 % และแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเป็นเวลา 3 วัน ผลการทดลอง ในรูปที่ 4.6 พบว่า แป้งมัน

สำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสเป็นเวลา 5 นาที (38%DE) ผลิตสารที่มีประสิทธิภาพฆ่าไรทะเลสูงสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm ทดสอบกับไรทะเลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นในการศึกษาต่อไปเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสเป็นเวลา 5 นาที มีค่า DE 38% เป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป



รูปที่ 4.6 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อประสิทธิภาพในการสร้างสารฆ่าแมลง ของเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB เป็นเวลา 3 วัน (ใช้สารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 442 ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดแทนกลูโคส โดยแปรความเข้มข้นที่ 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน พบว่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้การออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลสูงสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลเท่ากับ 95.55 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.7ก ขณะที่ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้สารออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลสูงสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลเท่ากับ 88.31 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.7ข

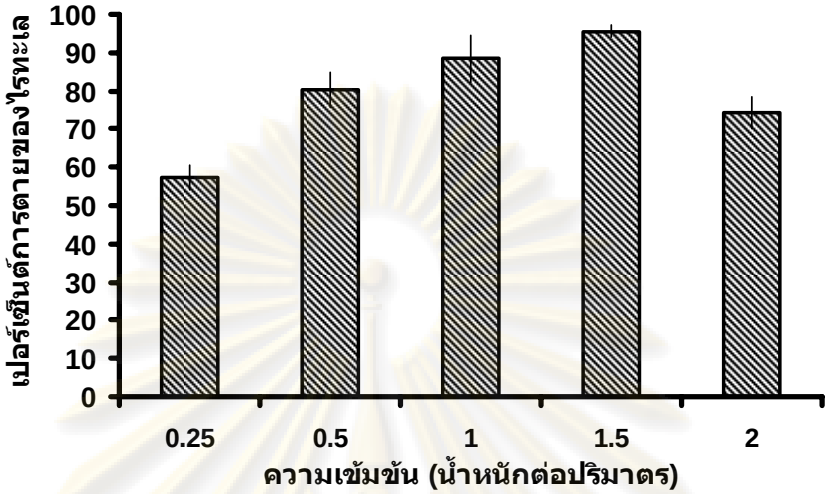
ในการศึกษาการเจริญของสายพันธุ์ 442 โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียง (ภาคผนวก ค หมายเลข 6) จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากเซลล์ (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) พบว่าปริมาณโปรตีนจากเซลล์จะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพด แต่กลับลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นที่ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนทั้งในแป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพด อาจเนื่องจากว่าแป้งมีปริมาณมากเกินไป ทำให้รบกวนการให้อากาศแก่เชื้อ ทำให้เชื้อเจริญได้ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในน้ำเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ค หมายเลข 3) เทียบกับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด (ภาคผนวก ค หมายเลข 2) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าเชื้อสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดในการเจริญได้ดี

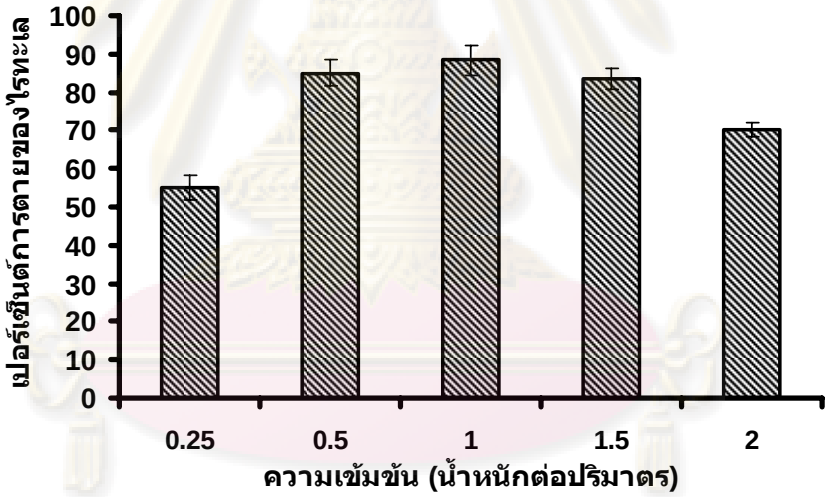
ดังนั้นจึงเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน มาใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากมีราคาถูกกว่าแป้งข้าวโพดถึง 3 เท่า และประเทศไทยสามารถผลิตแป้งมันสำปะหลังได้ปริมาณสูง ในขณะที่ยังต้องนำเข้าแป้งข้าวโพดจากต่างประเทศเป็นส่วนมาก และให้ผลในการฆ่าไรทะเลที่ดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.7 ผลของความเข้มข้นของ (ก) แป้งมันสำปะหลัง และ (ข) แป้งข้าวโพด ต่อ การสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลโดยสายพันธุ์ 442 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน (ใช้สารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดต่อการเจริญของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB เป็นเวลา 3 วัน

แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (น้ำหนักต่อปริมาตร)	โปรตีนจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)	ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด (กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหาร (กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)
แป้งมันสำปะหลัง	0.25	60.94	1.75	0.13
	0.50	79.69	3.25	0.14
	1.00	150.0	6.75	2.92
	1.50	234.38	9.5	3.31
	2.00	181.25	13.5	5.92
แป้งข้าวโพด	0.25	46.88	1.80	0.13
	0.50	70.31	3.75	0.17
	1.00	140.63	7.00	2.69
	1.50	187.50	9.74	3.46
	2.00	134.38	13.75	5.95

ขณะที่การเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 449 ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดแทนกลูโคส โดยแปรความเข้มข้นที่ 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน พบว่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้สารออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลสูงสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลเท่ากับ 94.39 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.8ก ขณะที่ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้สารออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลสูงสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลเท่ากับ 92.22 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.8ข

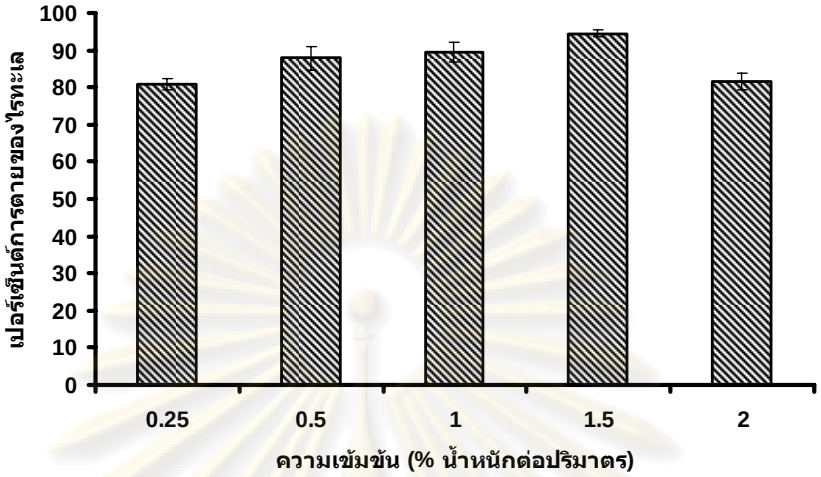
ในการศึกษาการเจริญของสายพันธุ์ 449 โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากเซลล์ พบว่าปริมาณโปรตีนจากเซลล์จะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพด แต่กลับลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นที่ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนทั้งในแป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพด อาจเนื่องจากว่าแป้งมีปริมาณมากเกินไป ทำให้รบกวนการให้อากาศแก่เชื้อ ทำให้เชื้อเจริญได้ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในน้ำเลี้ยงเชื้อ เทียบกับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าเชื้อสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดในการเจริญได้ดี

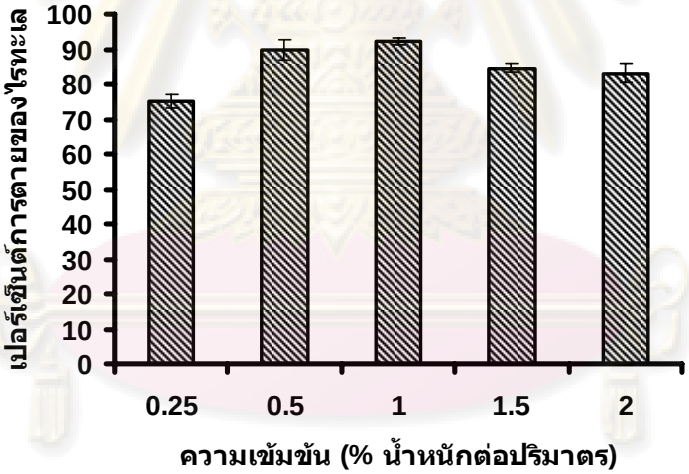
ดังนั้นจึงเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน มาใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากมีราคาถูกกว่าแป้งข้าวโพด และให้ผลในการฆ่าไรทะเลที่ดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.8 ผลของความเข้มข้นของ (ก) แป้งมันสำปะหลัง และ (ข) แป้งข้าวโพด ต่อ การสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลโดยสายพันธุ์ 449 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน (ใช้สารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดต่อการเจริญของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 449 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB เป็นเวลา 3 วัน

แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (น้ำหนักต่อปริมาตร)	โปรตีนจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น (กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหาร (กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)
แป้งมันสำปะหลัง	0.25	140.63	1.75	0.12
	0.50	328.13	3.25	0.35
	1.00	440.63	6.75	1.64
	1.50	459.38	9.50	2.15
	2.00	437.50	13.5	4.82
แป้งข้าวโพด	0.25	182.81	1.80	0.10
	0.50	360.94	3.75	0.62
	1.00	459.38	7.00	2.15
	1.50	487.50	9.74	3.28
	2.00	455.63	13.75	5.77

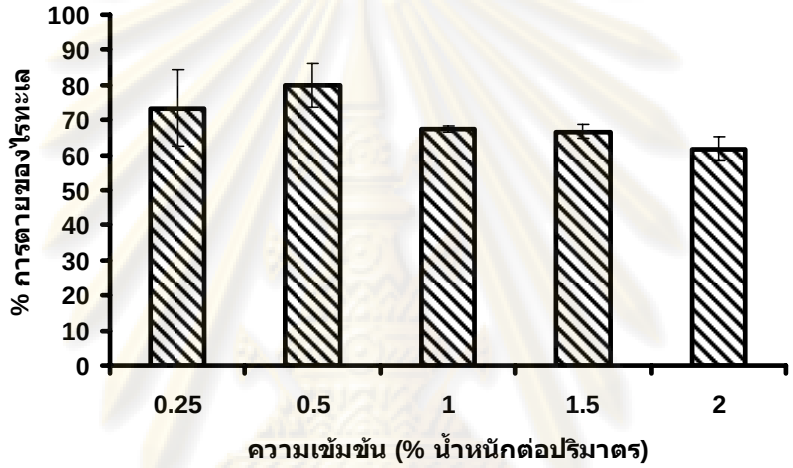
และจากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ O145702 ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลสมีค่า DE 38% แทนกลูโคส โดยแปรความเข้มข้นที่ 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน พบว่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลสที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้สารที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.9

ในการศึกษาการเจริญของสายพันธุ์ O145702 โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากเซลล์ พบว่าปริมาณโปรตีนจากเซลล์จะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลสแต่กลับลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน อาจเนื่องจากว่าแป้งส่วนที่ยังไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์รบกวนการให้อากาศแก่เชื้อ เมื่อเพิ่มความ

เข้มข้นแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลสมากขึ้น ทำให้เชื้อเจริญได้ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในน้ำเลี้ยงเชื้อ เทียบกับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าเชื้อสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลสในการเจริญได้ดี

ดังนั้นจึงเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน มาใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.9 ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสมีค่า DE 38% ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลโดยสายพันธุ์ O145702 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน (ใช้ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ถูกย่อยด้วยอะไมเลสมีค่า DE 38% ต่อการเจริญของ *Streptomyces* สายพันธุ์ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB เป็นเวลา 3 วัน

แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (น้ำหนักต่อปริมาตร)	โปรตีนจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น (กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหาร (กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)
แป้งมันสำปะหลังที่	0.25	45.75	1.5	0.12
ถูกย่อยด้วยอะไมเลสมี	0.50	52.50	2.9	1.00
ค่า DE 38%	1.00	50.76	5.75	2.67
	1.50	45.55	8.5	4.26
	2.00	42.25	11.25	6.38

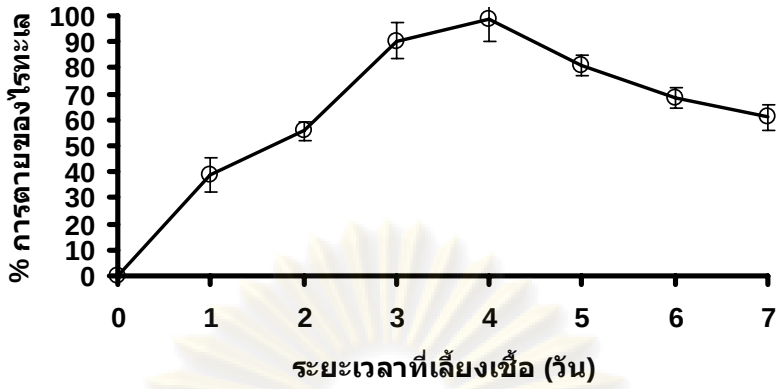
4.4.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 442 ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 0-7 วัน ผลการทดลองในรูปที่ 4.10 พบว่าให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุดประมาณ 98.50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัด 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 4 วัน ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงเลือกระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4 วัน เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

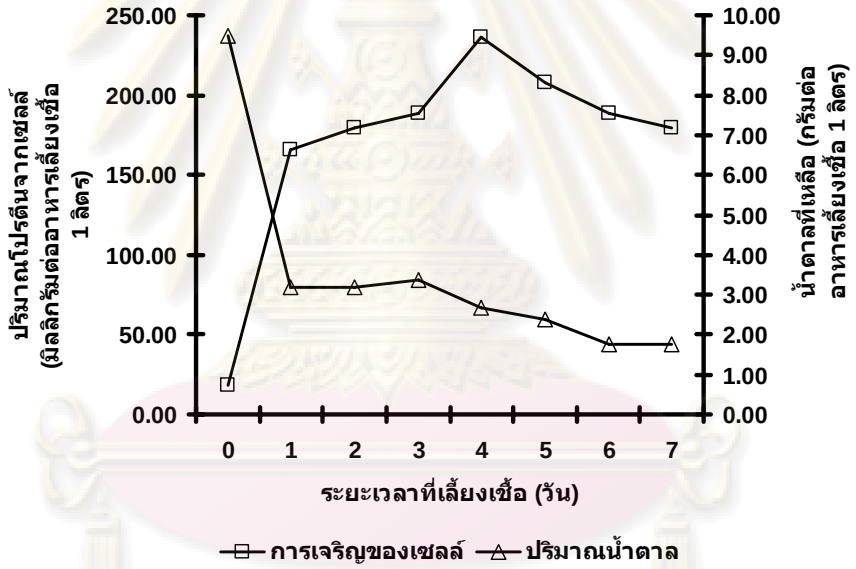
การวิเคราะห์การเจริญของสายพันธุ์ 442 โดยหาปริมาณโปรตีนจากเซลล์ พบว่าปริมาณโปรตีนจากเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ นั่นคือเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป โดยมีค่าการเจริญสูงสุดเฉลี่ย 235.94 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงใน รูปที่ 4.11

ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในน้ำเลี้ยงเชื้อในแต่ละช่วงการทดลอง จากผลการทดลองพบว่าในการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด จะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าเชื้อมีการนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญของเชื้อ แสดงดังรูปที่ 4.11

ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงเลือกระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4 วัน เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.10 ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล ณ ชั่วโมงที่ 24 จากสารสกัดหยาบที่ 50 ppm โดย *Streptomyces* sp. 442 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.11 ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่และการเจริญของสายพันธุ์ 442 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 7 วัน

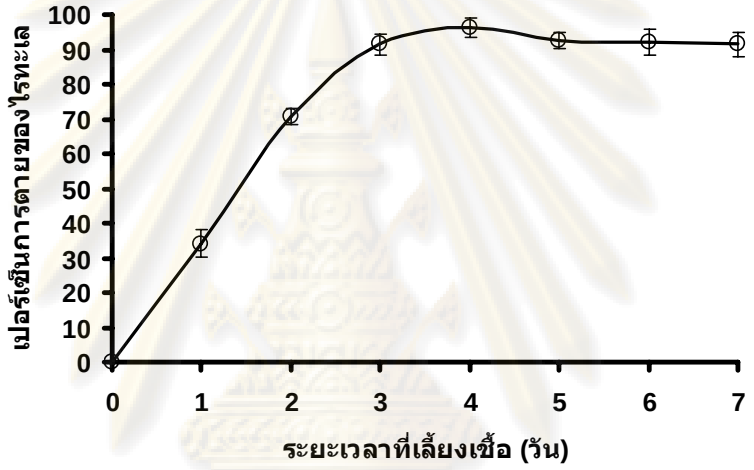
ขณะที่การเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 449 ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 0-7 วัน ผลการทดลองในรูปที่ 4.12 พบว่าให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุดประมาณ 96.23 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัด 50 ppm บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 4 วัน

การวิเคราะห์การเจริญของสายพันธุ์ 449 โดยหาปริมาณโปรตีนจากเซลล์ พบว่าปริมาณโปรตีนจากเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ นั่นคือเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป โดยมีค่าการเจริญ

สูงสุดเฉลี่ย 440.625 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงใน รูปที่ 4.13

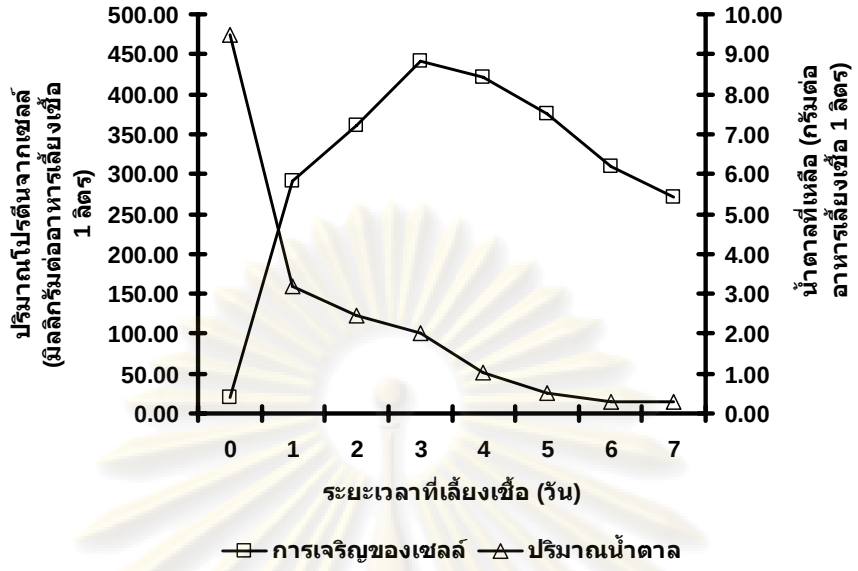
ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในน้ำเลี้ยงเชื้อในแต่ละช่วงการทดลอง จากผลการทดลองพบว่าในการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด จะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าเชื้อมีการนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญของเชื้อ แสดงดังรูปที่ 4.13

ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงเลือกระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4 วัน เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.12 ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล ณ ชั่วโมงที่ 3 จากสารสกัดหยาบที่ 50 ppm โดย *Streptomyces* sp. 449 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



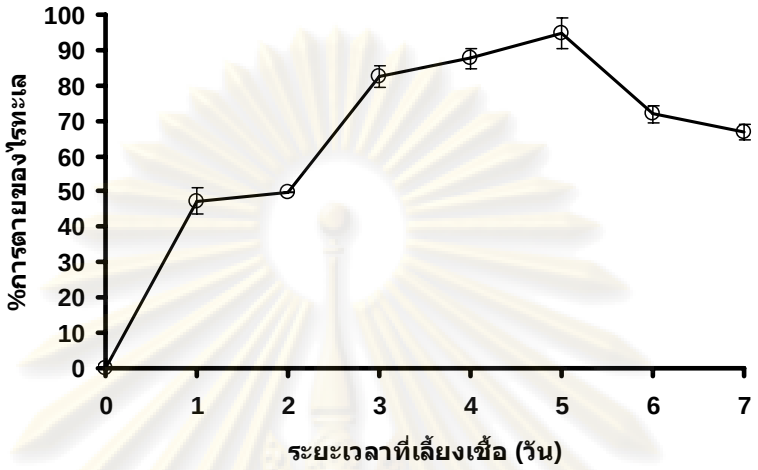
รูปที่ 4.13 ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่และการเจริญของสายพันธุ์ 449 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 7 วัน

และจากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ O145702 ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลสมีค่า DE เท่ากับ 38% ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 0-7 วัน ผลการทดลองในรูปที่ 4.14 พบว่าให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลประมาณ 94.67 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัด 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน

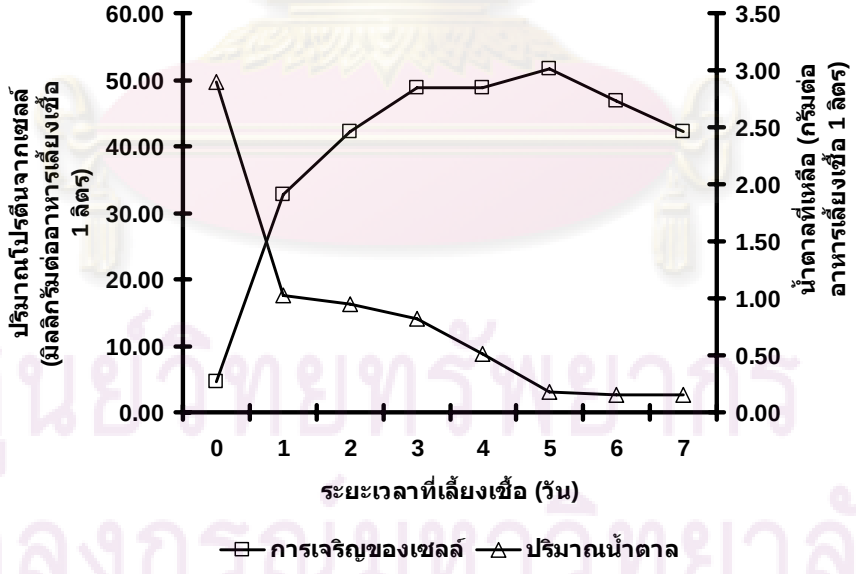
การวิเคราะห์การเจริญของสายพันธุ์ O145702 โดยหาปริมาณโปรตีนจากเซลล์ พบว่าปริมาณโปรตีนจากเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ นั่นคือเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป โดยมีค่าการเจริญสูงสุดเฉลี่ย 51.56 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 4.15

ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในน้ำเลี้ยงเชื้อในแต่ละช่วงการทดลอง จากผลการทดลองพบว่าในการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่เวลา 5 นาที มีค่า DE เท่ากับ 38% ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด จะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าเชื้อมีการนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญของเชื้อ แสดงดังรูปที่ 4.15

ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงเลือกระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5 วัน เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.14 ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล ณ ชั่วโมงที่ 24 จากสารสกัดหยาบที่ 50 ppm โดย *Streptomyces* sp. O145702 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่เวลา 5 นาที มีค่า DE เท่ากับ 38% ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.15 ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่และการเจริญของสายพันธุ์ O145702 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่เวลา 5 นาที มีค่า DE เท่ากับ 38% ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 7 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ผลของอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดย *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

4.5.1 ชนิดของอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม

นำ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับสายพันธุ์ 442 และ 449 และแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับ O145702 แปรแหล่งไนโตรเจนเป็นอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract), เพบโทน (peptone), แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl), แอมโมเนียมซัลเฟต($(NH_4)_2SO_4$), ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) และโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) และให้มีความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.074 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งเป็นความเข้มข้นในสูตรเดิม (ภาคผนวก ง หมายเลข 1) เปรียบเทียบสูตรเดิม (สารสกัดจากยีสต์กับโพแทสเซียมไนเตรต) โดยเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน สำหรับสายพันธุ์ 442 และ 449 และเวลา 5 วัน สำหรับสายพันธุ์ O145702 จากนั้นได้ทำการทดสอบผลการฆ่าไรทะเลเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ แล้วเลือกความข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบจากแต่ละเชื้อที่ให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลไม่เกิน 100 เปอร์เซ็นต์ มาเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ผลการทดลองในตารางที่ 4.6 พบว่า สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุดสำหรับสายพันธุ์ 442 และ 449 โดยสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นสาร 25 ppm จากสายพันธุ์ 442 ให้เปอร์เซ็นต์การตายประมาณ 70.55 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นสาร 5 ppm จากสายพันธุ์ 449 สามารถฆ่าไรทะเลได้ 81.58 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างสารสกัดจากยีสต์กับโพแทสเซียมไนเตรต ขณะที่สายพันธุ์ O145702 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างสารสกัดจากยีสต์กับโพแทสเซียมไนเตรต ให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลสูงสุดประมาณ 92.70 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะกลุ่มอนินทรีย์ไนโตรเจน พบว่า $(NH_4)_2HPO_4$ ให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุด โดยสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นสาร 25 ppm จากสายพันธุ์ 442 ให้เปอร์เซ็นต์การตายประมาณ 58 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นสาร 5 ppm จากสายพันธุ์ 449 สามารถฆ่าไรทะเลได้ 61.58 เปอร์เซ็นต์ และ 50 ppm จาก O145702 สามารถฆ่าไรทะเลได้ 57.23 เปอร์เซ็นต์

ผลวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากเซลล์ ผลการทดลองในตารางที่ 4.7 พบว่าทุกสายพันธุ์เจริญในแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนดีกว่าแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน อาจเนื่องจากว่าเชื้อนำแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตได้ง่ายกว่าแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ความเข้มข้นสูงอาจมีความเป็นพิษซึ่งอาจยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้

ดังรายงานของ Basak และคณะ (1973) พบว่า แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต และ แอมโมเนียมไนเตรต มีผลทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น เป็นผลให้ยับยั้งการเจริญของเชื้อ และให้ผลผลิต kanamycin น้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

ตารางที่ 4.6 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.074 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเล ของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

แหล่งไนโตรเจน	เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลเวลาทดสอบ 24 ชั่วโมง		
	449 (5 ppm)	442 (25 ppm)	O145702 (50 ppm)
สารสกัดจากยีสต์ + KNO_3	69.96 ± 3.03	61.28 ± 4.77	92.70 ± 1.36
สารสกัดจากยีสต์	81.58 ± 2.12	70.55 ± 3.54	70.79 ± 1.78
เพบโทน	75.36 ± 2.82	59.26 ± 3.24	72.50 ± 2.50
NH_4Cl	51.77 ± 2.53	40.09 ± 6.27	52.39 ± 1.70
$(NH_4)_2SO_4$	29.84 ± 3.84	41.18 ± 4.29	45.12 ± 0.48
$(NH_4)_2HPO_4$	61.58 ± 3.08	58.00 ± 5.42	57.23 ± 1.91
KNO_3	37.58 ± 2.66	49.72 ± 4.58	52.83 ± 2.27

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.074 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

แหล่งไนโตรเจน	โปรตีนจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)		
	449	442	O145702
สารสกัดจากยีสต์ + KNO_3	432.19 ± 2.21	235.94 ± 3.83	52.63 ± 2.21
สารสกัดจากยีสต์	464.69 ± 3.83	260.25 ± 2.21	60.25 ± 3.83
เพบโทน	445.31 ± 2.21	248.25 ± 2.21	55.50 ± 2.21
NH_4Cl	132.81 ± 0.00	92.38 ± 3.83	17.19 ± 2.21
$(NH_4)_2SO_4$	171.19 ± 2.21	106.75 ± 2.21	17.19 ± 2.21
$(NH_4)_2HPO_4$	192.19 ± 2.21	115.25 ± 0.00	45.15 ± 3.83
KNO_3	171.19 ± 2.21	108.23 ± 2.21	32.81 ± 2.21

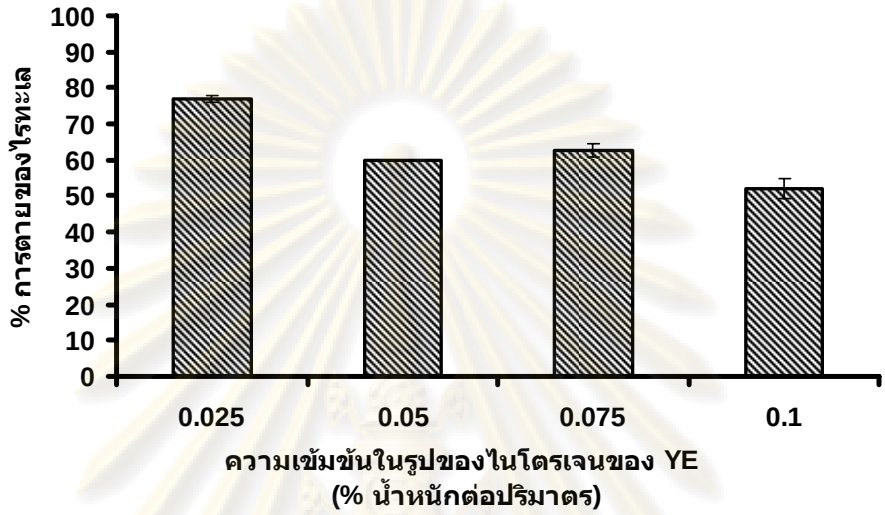
4.5.2 ผลของความเข้มข้นของอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

4.5.2.1 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง ของสายพันธุ์ 442 และ 449

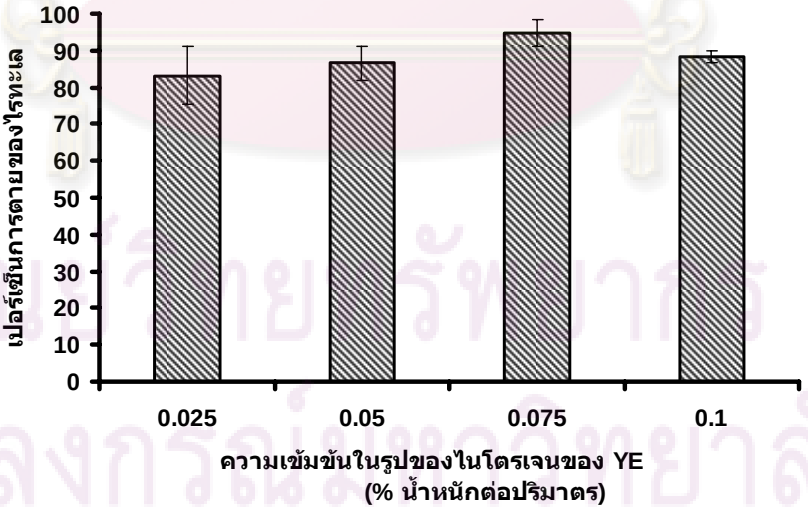
จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 442 และ 449 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน โดยแปรความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนที่ 0.025, 0.05, 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน จากการทดลองพบว่าสายพันธุ์ 442 ที่เลี้ยงในสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนที่ 0.025 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้สารที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลประมาณ 76.88 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสาร 25 ppm บ่มปั่นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 4.16 ขณะที่สารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.075 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้สารที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุดประมาณ 94.87 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสายพันธุ์ 449 ที่ความเข้มข้นสาร 5 ppm บ่มปั่นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 4.17

สำหรับการเจริญของสายพันธุ์ 442 และ 449 พบว่าเซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนของสารสกัดจากยีสต์มากขึ้นทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนที่ 0.025 และ 0.075 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับสายพันธุ์ 442 และ 449 ตามลำดับ มาใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.16 ผลของความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของสายพันธุ์ 442 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (ใช้สารสกัดหยาบ 25 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



รูปที่ 4.17 ผลของความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของสายพันธุ์ 449 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (ใช้สารสกัดหยาบ 5 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ตารางที่ 4.8 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ ต่อการเจริญของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442 และ 449

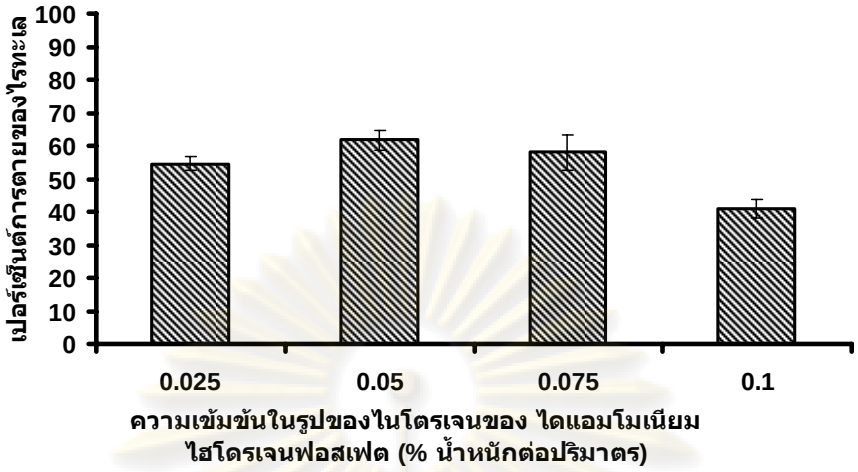
สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน (%น้ำหนักต่อปริมาตร)	โปรตีนจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)	
	442	449
0.025	180.25 ± 5.85	292.19 ± 2.21
0.050	220.50 ± 3.83	404.69 ± 5.85
0.075	260.25 ± 2.21	464.69 ± 3.83
0.100	290.65 ± 2.21	585.94 ± 3.83

4.5.2.2 ผลของความเข้มข้นของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง ของสายพันธุ์ 442 และ 449

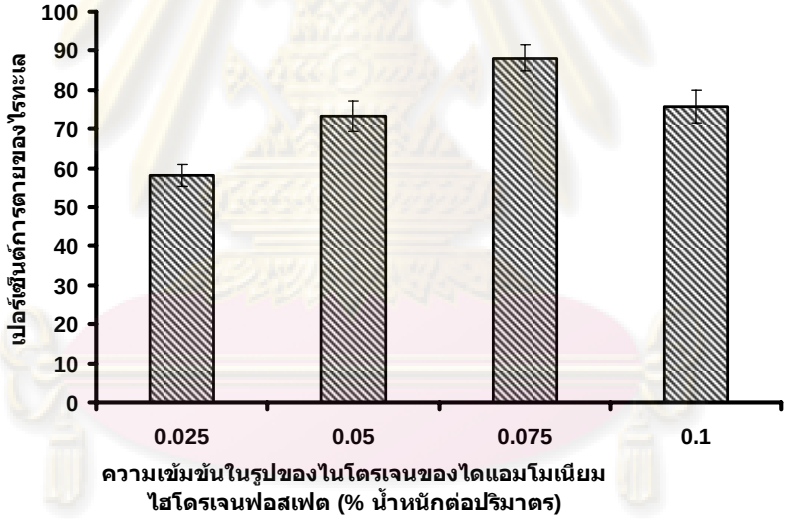
จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 442 และ 449 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน โดยแปรความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจนที่ 0.025, 0.05, 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ให้สารที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุดสำหรับสายพันธุ์ 442 โดยให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลประมาณ 61.63 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสายพันธุ์ 442 ที่ความเข้มข้นสาร 25 ppm บ่มปั่นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 4.18 ขณะที่ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้สารที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุดสำหรับสายพันธุ์ 449 โดยให้การตายของไรทะเล 88.08 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสาร 5 ppm บ่มปั่นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 4.19

สำหรับการเจริญของสายพันธุ์ 442 และ 449 โดยวิเคราะห์จากปริมาณโปรตีนจากเซลล์ พบว่าเซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนของ $(NH_4)_2HPO_4$ มากขึ้นทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ดังนั้นจึงเลือกใช้ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนที่ 0.05 และ 0.075 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับสายพันธุ์ 442 และ 449 ตามลำดับ มาใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.18 ผลของความเข้มข้น $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง ของสายพันธุ์ 442 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (ใช้สารสกัดหยาบ 25 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



รูปที่ 4.19 ผลของความเข้มข้น $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง ของสายพันธุ์ 449 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (ใช้สารสกัดหยาบ 5 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.9 ผลของความเข้มข้นของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ต่อการเจริญของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442 และ 449

$(NH_4)_2HPO_4$ ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน (%น้ำหนักต่อปริมาตร)	โปรตีนจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)	
	442	449
0.025	96.25 ± 2.21	175.00 ± 4.42
0.050	115.50 ± 2.21	189.69 ± 2.21
0.075	125.25 ± 3.38	214.06 ± 2.21
0.100	145.25 ± 3.38	226.56 ± 2.21

4.5.2.3 การหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารสกัดจากยีสต์กับโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) หรือไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง โดยในสายพันธุ์ O145702

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.6 พบว่า *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ O145702 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างสารสกัดจากยีสต์กับ KNO_3 เทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.074 เปอร์เซ็นต์ ให้สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงสูงสุด ขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอนินทรีย์ไนโตรเจน $(NH_4)_2HPO_4$ ให้การสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงสูงสุด การทดลองนี้จึงทำการแปรเพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารสกัดยีสต์กับ KNO_3 หรือ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ให้ความเข้มข้นรวมเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.074 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงการแปรสัดส่วนในภาคผนวก ง หมายเลข 2 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองในตารางที่ 4.10 พบว่า สารสกัดจากยีสต์กับ KNO_3 เท่ากับ 0.2 ต่อ 0.38 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้สารที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุด ประมาณ 90.7 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสาร 50 ppm บ่มปั่นเวลา 24 ชั่วโมง ขณะที่ปริมาณระหว่างสารสกัดจากยีสต์กับ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ 0.2 ต่อ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้สารที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุดประมาณ 88.85 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ ที่ความเข้มข้นสาร 5 ppm บ่มปั่นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการเจริญของสายพันธุ์ O145702 พบว่าเซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณของสารสกัดจากยีสต์มากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.10

ดังนั้นจึงเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างสารสกัดจากยีสต์กับ KNO_3 ที่สัดส่วนสารสกัดจากยีสต์กับ KNO_3 เท่ากับ 0.2 ต่อ 0.38 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ตารางที่ 4.10 ผลของสัดส่วนปริมาณระหว่างสารสกัดจากยีสต์กับโพแทสเซียมไนเตรต หรือกับไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน เท่ากับ 0.074 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการเจริญของเชื้อ O145702 และต่อเปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลที่ 24 ชั่วโมง (โดยใช้ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 50 ppm) เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

แหล่งไนโตรเจน	โปรตีนจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)	เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล
0.05% สารสกัดจากยีสต์+0.5% KNO_3	44.25 ± 2.21	73.84 ± 4.4
0.1% สารสกัดจากยีสต์+0.46% KNO_3	50.50 ± 3.38	75.3 ± 3.89
0.2% สารสกัดจากยีสต์+0.38% KNO_3	55.25 ± 2.21	90.7 ± 1.36
0.05% สารสกัดจากยีสต์+0.325% $(NH_4)_2HPO_4$	46.40 ± 2.21	68.65 ± 2.97
0.1% สารสกัดจากยีสต์+0.3% $(NH_4)_2HPO_4$	52.25 ± 3.38	73.43 ± 2.72
0.2% สารสกัดจากยีสต์+0.25% $(NH_4)_2HPO_4$	57.50 ± 2.21	88.85 ± 1.65

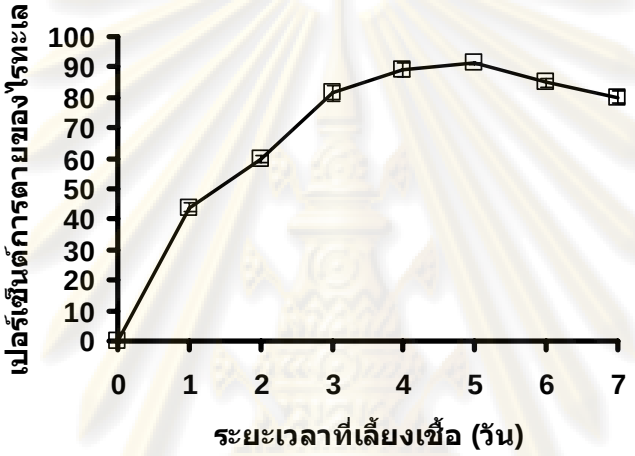
4.5.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงเมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

4.5.3.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ 442 เพื่อสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง เมื่อใช้สกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน และมีแป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 442 ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีสารสกัดจากยีสต์ ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.025 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน และมีแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 0-7 วัน ผลการทดลองในรูปที่ 4.20 พบว่า

ให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุดประมาณ 91.16 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัด 25 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์ พบว่าจากวันแรกของการเลี้ยงเชื้อจนสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีค่าสูงสุดเฉลี่ย 270.5 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงใน รูปที่ 4.21 และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่าจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าเชื้อมีการนำไปใช้ในการเจริญของเชื้อ และใช้หมดลงในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ แสดงดังรูปที่ 4.21



รูปที่ 4.20 ผลของระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442 เมื่อเลี้ยงด้วยแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.025 % (ใช้สารสกัดหยาบ 25 ppm บ่มเป็นเวลาที่ 24 ชั่วโมง)

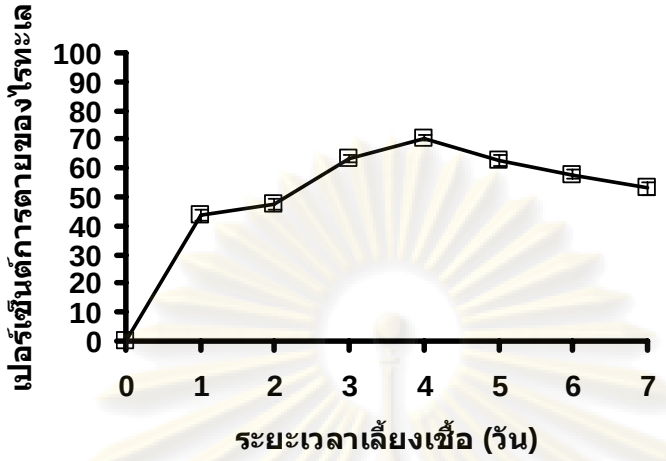
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.21 ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสายพันธุ์ 442 กับความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นในรูปไนโตรเจน 0.025 %

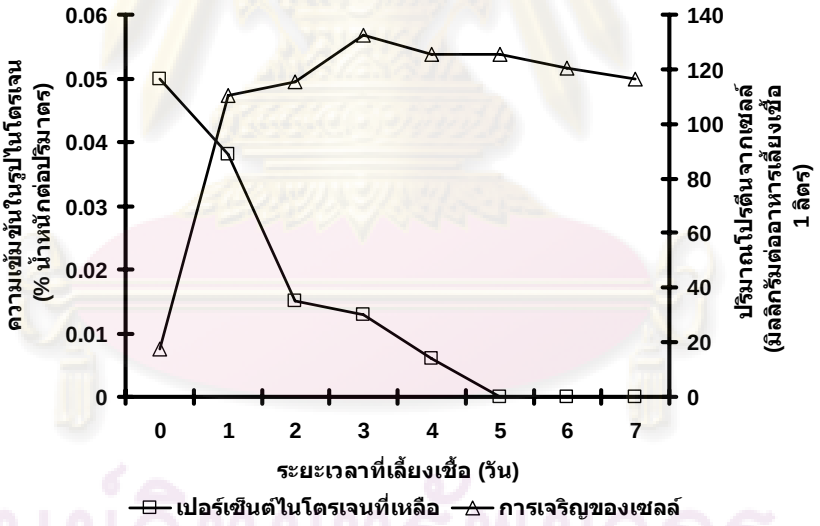
4.5.3.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ 442 เพื่อสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง เมื่อใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และมีแป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 442 ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก Luria-Bertani ที่มีไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และมีแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 0-7 วัน ผลการทดลองในรูปที่ 4.22 พบว่าให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุดประมาณ 70.42เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัด 25 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 4 วัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์ พบว่าจากวันแรกของการเลี้ยงเชื้อจนสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีค่าสูงสุดเฉลี่ย 132.5 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงใน รูปที่ 4.23 และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่าจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าเชื้อมีการนำไปใช้ในการเจริญของเชื้อ และใช้หมดลงในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ แสดงดังรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.22 ผลของระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442 เมื่อเลี้ยงด้วยแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.05 % (ใช้สารสกัดหยาบ 25 ppm บ่มเป็นเวลาที่ 24 ชั่วโมง)



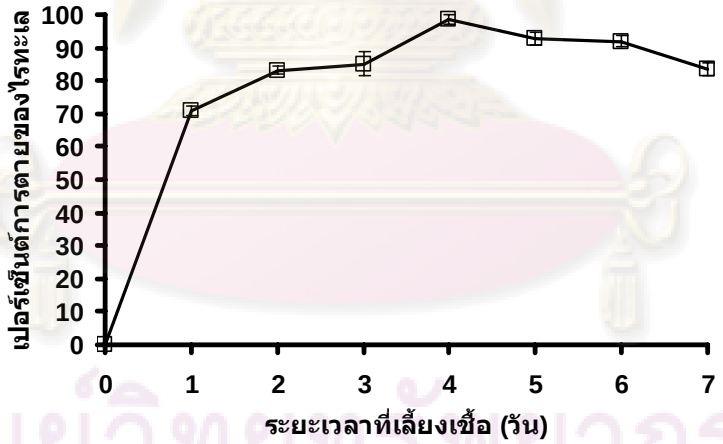
รูปที่ 4.23 ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสายพันธุ์ 442 กับความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นในรูปไนโตรเจน 0.05 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5.3.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ 449 เพื่อสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง เมื่อใช้สกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน และมีแป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน

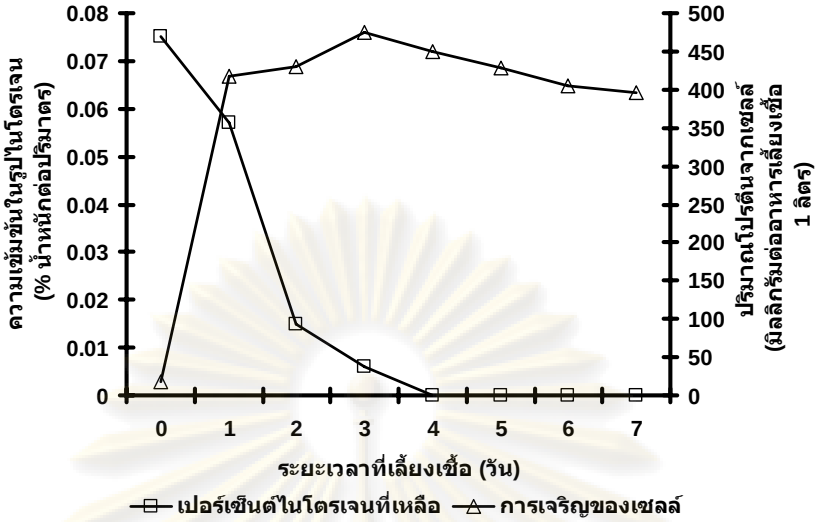
จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 449 ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีสารสกัดจากยีสต์ ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.075 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน และมีแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 0-7 วัน ผลการทดลองในรูปที่ 4.24 พบว่าให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุดประมาณ 98.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัด 5 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 4 วัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์ พบว่าจากวันแรกของการเลี้ยงเชื้อจนสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีค่าสูงสุดเฉลี่ย 475.25 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงใน รูปที่ 4.25 และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่าจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าเชื้อมีการนำไปใช้ในการเจริญของเชื้อและใช้หมดลงในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ แสดงดังรูปที่ 4.25



รูปที่ 4.24 ผลของระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 449 เมื่อเลี้ยงด้วยแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.075 % (ใช้สารสกัดหยาบ 5 ppm บ่มเป็นเวลาที่ 24 ชั่วโมง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

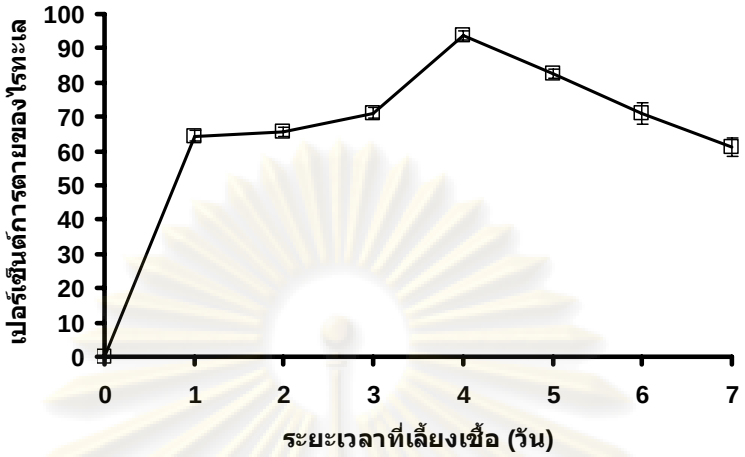


รูปที่ 4.25 ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสายพันธุ์ 449 กับความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นในรูปไนโตรเจน 0.075 %

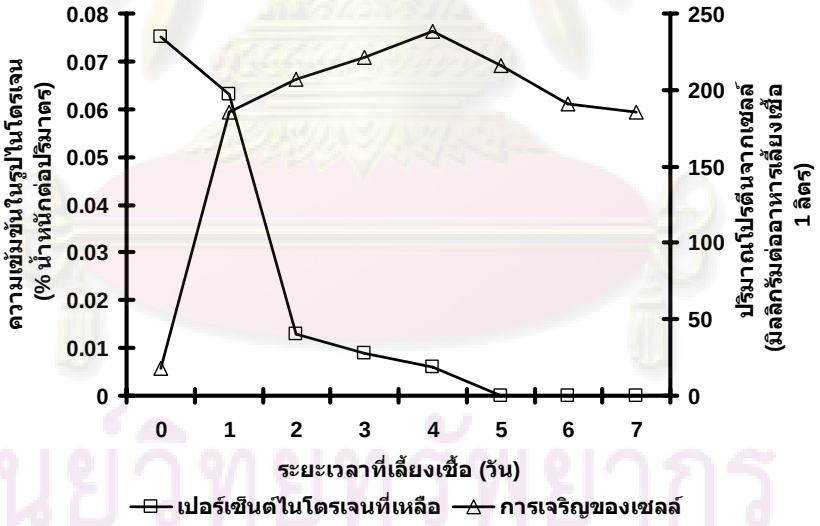
4.5.3.4 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ 449 เพื่อสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง เมื่อใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และมีแป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 449 ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.075 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และมีแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 0-7 วัน ผลการทดลองในรูปที่ 4.26 พบว่าให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุดประมาณ 93.8เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัด 5 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 4 วัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์ พบว่าจากวันแรกของการเลี้ยงเชื้อจนสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีค่าสูงสุดเฉลี่ย 238.06 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงใน รูปที่ 4.27 และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่าจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าเชื้อมีการนำไปใช้ในการเจริญของเชื้อและใช้หมดลงในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ แสดงดังรูปที่ 4.27



รูปที่ 4.26 ผลของระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 449 เมื่อเลี้ยงด้วยแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.075 % (ใช้สารสกัดหยาบ 5 ppm บ่มเป็นเวลาที่ 24 ชั่วโมง)

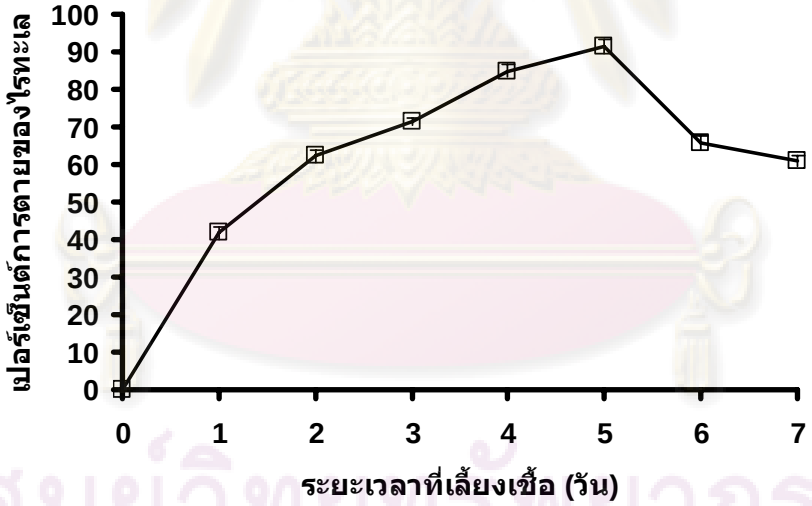


รูปที่ 4.27 ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสายพันธุ์ 449 กับความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นในรูปไนโตรเจน 0.075 %

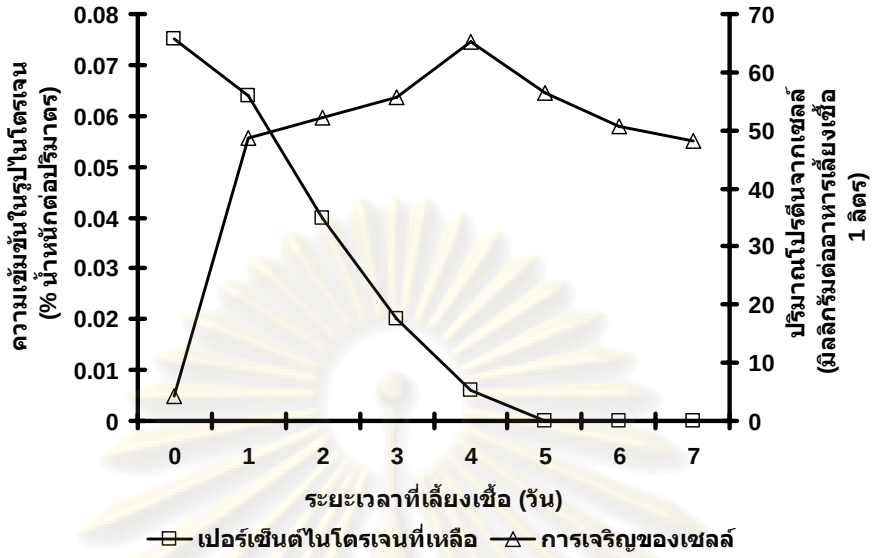
4.5.3.5 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ O145702 เพื่อสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ O145702 ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีไนโตรเจนผสมระหว่างสารสกัดจากยีสต์กับโพแทสเซียมไนเตรต ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.074 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส มีค่า DE 38 % ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 0-7 วัน ผลการทดลองในรูปที่ 4.28 พบว่าให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลสูงสุดประมาณ 91.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัด 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์ พบว่าจากวันแรกของการเลี้ยงเชื้อจนสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีค่าสูงสุดเฉลี่ย 65.25 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงใน รูปที่ 4.29 และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่าจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าเชื้อมีการนำไปใช้ในการเจริญ และใช้หมดลงในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ แสดงดังรูปที่ 4.29



รูปที่ 4.28 ผลของระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ O145702 เมื่อเลี้ยงด้วยแป้งมันสำปะหลังย่อยด้วยอะไมเลส ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างสารสกัดจากยีสต์กับ KNO_3 ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.074 % (ใช้สารสกัดหยาบ 50 ppm บ่มเป็นเวลาที่ 24 ชั่วโมง)



รูปที่ 4.29 ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสายพันธุ์ O145702 กับความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหลือ เมื่อเลี้ยงด้วยแป้งมันสำปะหลังย่อยด้วยอะไมเลส ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างสารสกัดจากยีสต์กับ KNO_3 ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.074 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

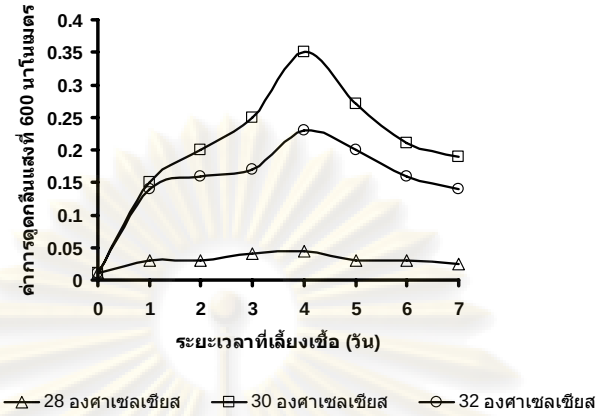
4.6.1 ผลของอุณหภูมิเบื้องต้นต่อการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 เมื่อเลี้ยงในสูตรดัดแปลง LB ที่มีกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

จากรายงานการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกลุ่มของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจาก *Streptomyces* spp. พบว่าอยู่ระหว่าง 28 และ 30 องศาเซลเซียส (Warr,1994, Mironov, 2003, Xiong, 2004, Gesheva, 2005 และ Zhuang, 2006) งานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบเบื้องต้นถึงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อคือ 28, 30, และ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0-7 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน ติดตามการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 30 และ 32 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเจริญได้ใกล้เคียงกัน แต่ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสายพันธุ์ 442 กลับพบว่าเชื้อมีการเจริญต่ำ ขณะที่สายพันธุ์ 449 และ O145702 เชื้อสามารถเจริญได้ และให้ผลการเจริญที่ใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 30 และ 32 องศาเซลเซียส แสดงดังรูปที่ 4.30

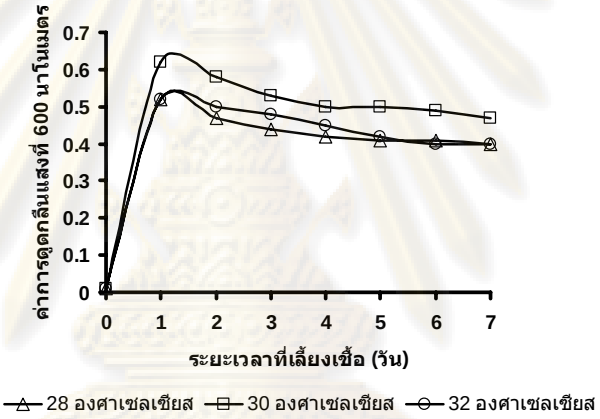
ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทดสอบผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดยเลือกใช้ อุณหภูมิ 28, 30, และ 32 องศาเซลเซียส สำหรับสายพันธุ์ 449 และ O145702 และใช้อุณหภูมิ 30 และ 32 องศาเซลเซียส สำหรับสายพันธุ์ 442 โดยนำมาเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

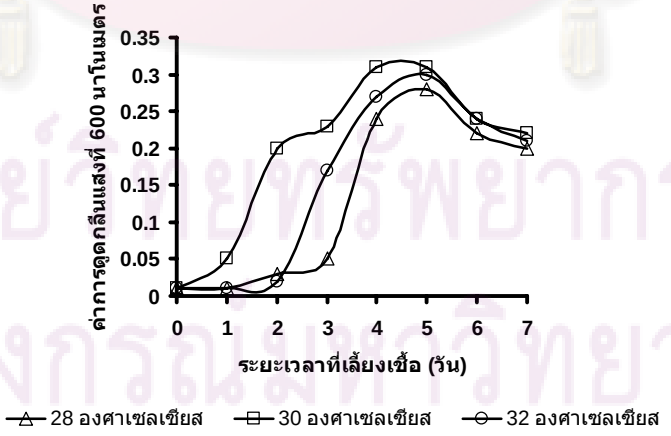
442



449



O145702



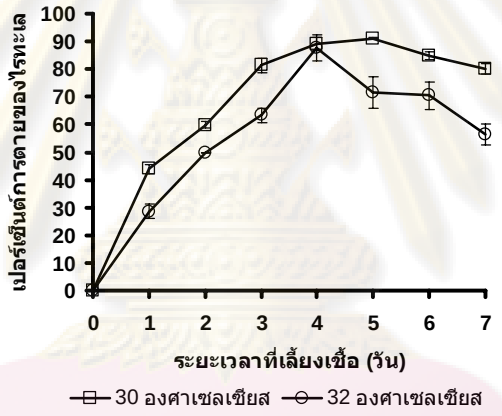
รูปที่ 4.30 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

4.6.2 ผลของอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

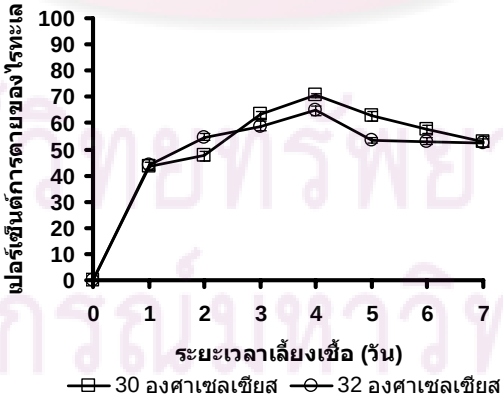
4.6.2.1 ผลของอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. 442 ต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

จากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ 442 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีแป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน หรือไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่ 30 และ 32 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 0-7 วัน พบว่า ที่ 30 องศาเซลเซียสทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นสารสกัดจากยีสต์ หรือไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลสูงสุดประมาณ 91.16 และ 70.42 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนที่ 32 องศาเซลเซียส ให้ประสิทธิภาพการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงต่ำกว่าเล็กน้อย ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.31 ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ 30 องศาเซลเซียส

(ก)



(ข)



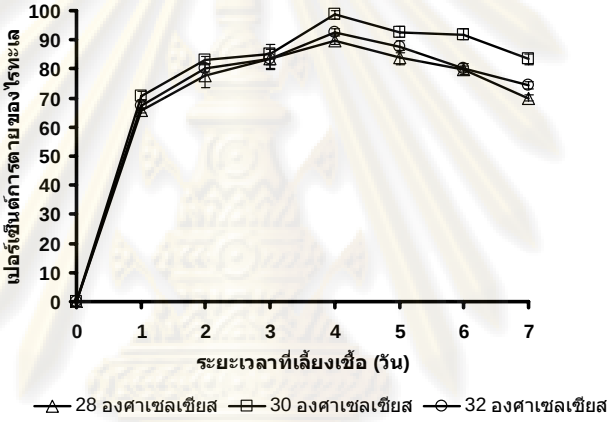
รูปที่ 4.31 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 442 เมื่อใช้ (ก) สารสกัดจากยีสต์ และ (ข) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน (ใช้สารสกัดหยาบเข้มข้น 25 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

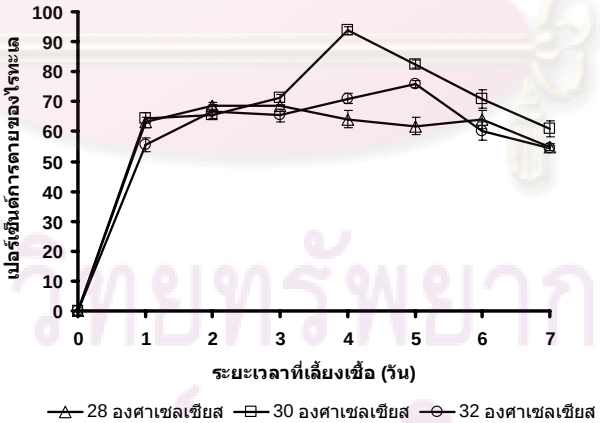
4.6.2.2 ผลของอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. 449 ต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

จากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ 449 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน หรือไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่ 28, 30 และ 32 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 0-7 วัน พบว่า ที่ 30 องศาเซลเซียส ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นสารสกัดจากยีสต์ หรือไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลสูงสุดประมาณ 98.58 และ 93.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนที่ 28 และ 32 องศาเซลเซียส ให้ประสิทธิภาพการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงต่ำกว่าเล็กน้อย ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.32 ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ 30 องศาเซลเซียส

(ก)



(ข)

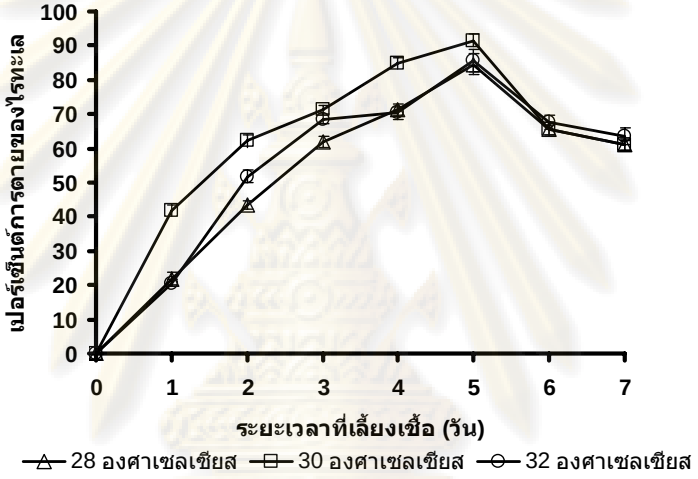


รูปที่ 4.32 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ 449 เมื่อใช้ (ก) สารสกัดจากยีสต์ และ (ข) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน (ใช้สารสกัดหยาบเข้มข้น 5 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6.2.3 ผลของอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. O145702 ต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

จากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ O145702 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก LB ที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนผสมระหว่างสารสกัดจากยีสต์และโพแทสเซียมไนเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่ 28, 30 และ 32 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 0-7 วัน พบว่า ที่ 30 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลสูงสุดประมาณ 91.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 28 และ 32 องศาเซลเซียส ให้ประสิทธิภาพการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงต่ำกว่าเล็กน้อย ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.33 ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ 30 องศาเซลเซียส

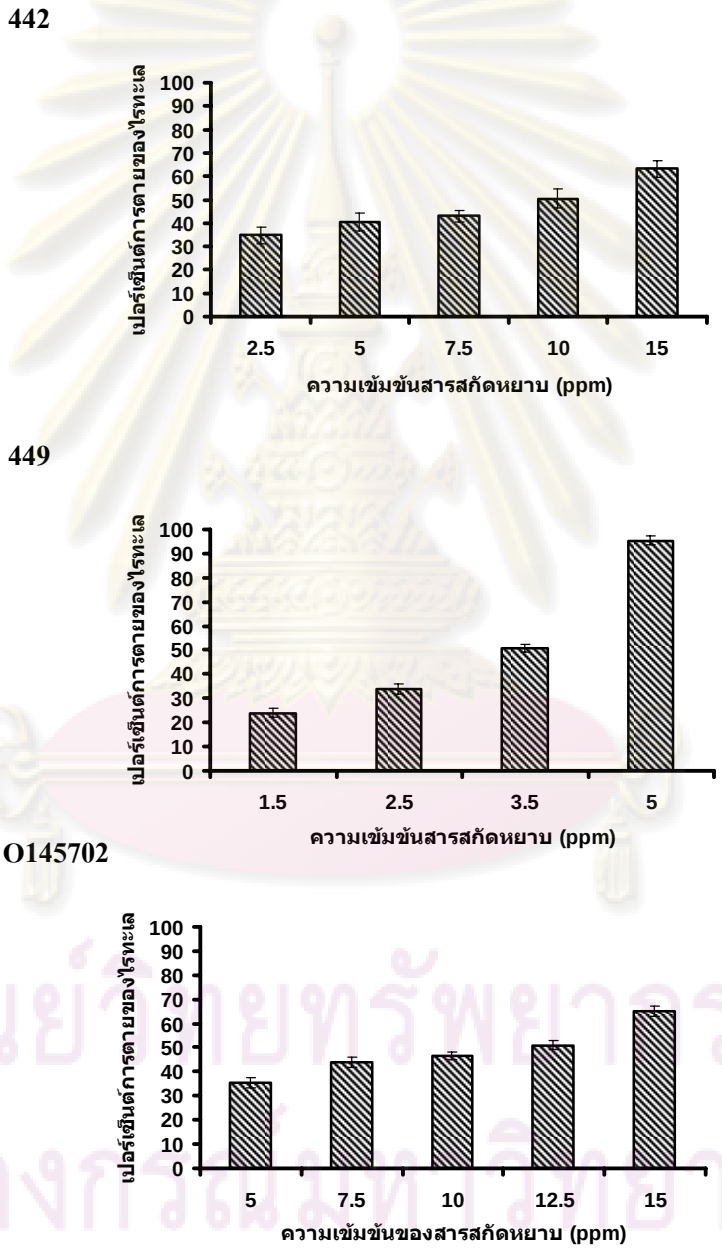


รูปที่ 4.33 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* สายพันธุ์ O145702 เมื่อใช้ไนโตรเจนผสมระหว่างสารสกัดจากยีสต์และโพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน (ใช้สารสกัดหยาบเข้มข้น 50 ppm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 ผลของความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ทำให้ ไรทะเลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนเริ่มต้น (LD_{50})

จากการหาความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ทำให้ ไรทะเลตายเป็นจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนเริ่มต้น (LD_{50}) โดยทำการทดลองตามวิธี Martins และคณะ (2007) พบว่า สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ให้ค่า LD_{50} ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 10, 3.5 และ 12.5 ppm ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบกับไรทะเลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.34



รูปที่ 4.34 ผลของความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ทำให้ไรทะเลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนเริ่มต้น (LD_{50})

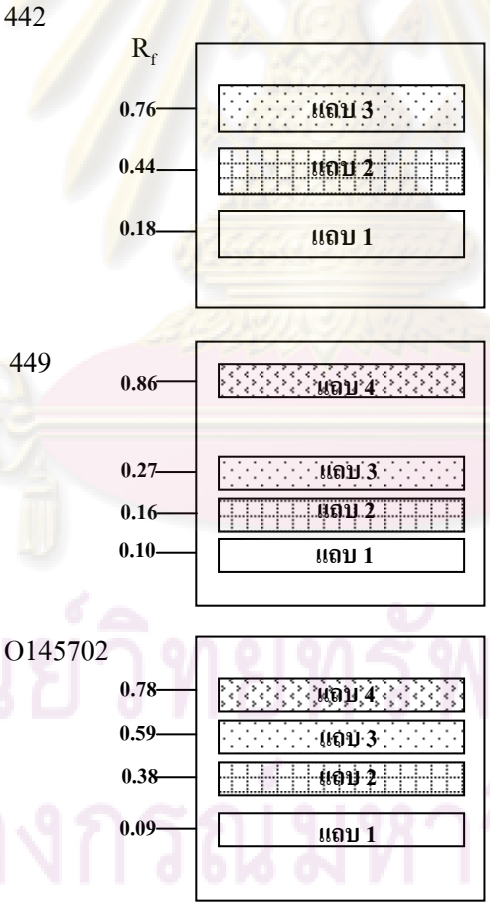
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 การแยกสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสารสกัดหยาบโดยวิธีโครมาโตกราฟฟี

การทดลองนี้จะทำการแยกองค์ประกอบในสารสกัดหยาบจากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ เพื่อตรวจสอบชนิดของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง

4.8.1 การแยกสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสารสกัดหยาบโดยวิธีทินแลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (Preparative Thin Layer chromatography, preparative TLC)

ได้ทำการแยกสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสารสกัดหยาบ โดยการลากสารสกัดหยาบที่ได้จากสายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ปริมาณ 44.6, 45.5 และ 38.6 มิลลิกรัม ตามลำดับ ที่ละลายในเอทิลอะซิเทต 1.5 มิลลิลิตร ลงบนแผ่น preparative TLC (silica gel 60 F254, E. Merck, Germany) นำแผ่นใส่ลงในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยสารละลายเอทิลอะซิเทต พบว่าสามารถแยกองค์ประกอบในสารสกัดหยาบได้ 3 แถบจากสายพันธุ์ 442 และ 4 แถบจากสายพันธุ์ 449 และ O145702 เมื่อดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ดังแสดงเป็นรูปจำลองที่ 4.35 เนื่องจากไม่สามารถถ่ายภาพได้



รูปที่ 4.35 รูปจำลองการแยกสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* spp.สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702โดยใช้ Preparetive Thin Layer Chromatography

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากนั้นขูดแต่ละแถบมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเทต ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.4 และนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ในการฆ่าไรทะเลตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.2 ผลการทดลองในตารางที่ 4.11 พบว่าสายพันธุ์ 442 แถบ 1 มีฤทธิ์ในการฆ่าไรทะเลสูงสุด ให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลสูงถึง 88.71 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเข้มข้นสาร 5 ppm ขณะที่สายพันธุ์ 449 แถบ 4 มีฤทธิ์ในการฆ่าไรทะเลสูงสุดสุด ให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลสูงถึง 79.32 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเข้มข้นสาร 5 ppm ดังแสดงในตารางที่ 4.12 และสายพันธุ์ O145702 พบว่าแถบ 3 และ 4 มีฤทธิ์ในการฆ่าไรทะเลสูงสุดสุด และรองลงมาตามลำดับ โดยให้เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเลสูงถึง 79.52 และ 67.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อใช้ความเข้มข้นสาร 5 ppm ดังแสดงในตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.11 ผลการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. 442 ที่แยกโดย Preparative Thin Layer Chromatography เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ

สารสกัดจาก *Streptomyces* sp.442 เมื่อผ่าน preparative TLC	เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล ณ ชั่วโมงที่ 24	
	5 ppm	50 ppm
สารสกัดหยาบ	67.54 ± 8.28	100.00 ± 0.00
แถบ 1	88.71 ± 7.20	100.00 ± 0.00
แถบ 2	5.76 ± 4.56	70.89 ± 6.04
แถบ 3	0.00 ± 0.00	17.54 ± 4.16

ตารางที่ 4.12 ผลการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. 449 ที่แยกโดย Preparative Thin Layer Chromatography เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ

สารสกัดจาก *Streptomyces* sp.449 เมื่อผ่าน preparative TLC	เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล ณ ชั่วโมงที่ 24	
	5 ppm	50 ppm
สารสกัดหยาบ	0.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
แถบ 1	0.00 ± 0.00	32.04 ± 9.57
แถบ 2	0.00 ± 0.00	81.99 ± 12.44
แถบ 3	0.00 ± 0.00	19.09 ± 16.50
แถบ 4	79.32 ± 13.76	100.00 ± 0.00

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

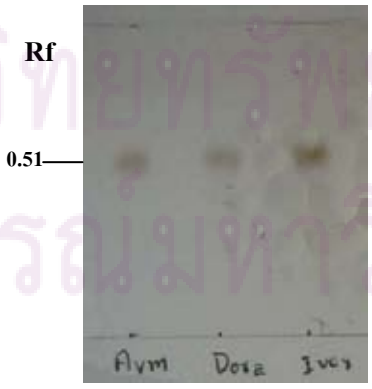
ตารางที่ 4.13 ผลการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของสารสกัดจาก *Streptomyces* sp.O145702 ที่แยกโดย Preparative Thin Layer Chromatography เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ

สารสกัดจาก *Streptomyces* sp. O145702 เมื่อผ่าน preparative TLC	เปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล ณ ชั่วโมงที่ 24	
	5 ppm	50 ppm
สารสกัดหยาบ	49.47 ± 5.19	91.72 ± 1.24
แถบ 1	19.68 ± 3.05	31.86 ± 1.50
แถบ 2	20.61 ± 1.74	42.77 ± 2.23
แถบ 3	79.52 ± 0.67	100.00 ± 0.00
แถบ 4	67.52 ± 1.21	100.00 ± 0.00

4.8.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดที่ผ่านการแยกโดย Preparative TLC โดย Analytical Thin Layer chromatography (Analytical TLC)

4.8.2.1 ผลการวิเคราะห์สารฆ่าแมลงมาตรฐาน (avermectin, doramectin และ ivermectin) โดย Analytical TLC

นำสารฆ่าแมลงมาตรฐานได้แก่ avermectin, doramectin และ ivermectin ซึ่งละลายในเอทิลอะซิเทต ที่ความเข้มข้น 500 ppm มาหยดลงบนแผ่นซิลิกาเจล แล้วนำแผ่นใส่ลงในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยเอทิลอะซิเทตตามวิธีข้อ 3.3.10.2.1 ดูตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสาร จากการทดลองพบว่า avermectin, doramectin และ ivermectin ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.51 แสดงในรูปที่ 4.36 เนื่องจากสารฆ่าแมลงมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ให้ค่า R_f เท่ากัน ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงเลือกใช้ avermectin เป็นตัวแทนของสารฆ่าแมลงมาตรฐาน ในการเปรียบเทียบกับสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงแต่ละแถบที่แยกโดย Preparative TLC จากสายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

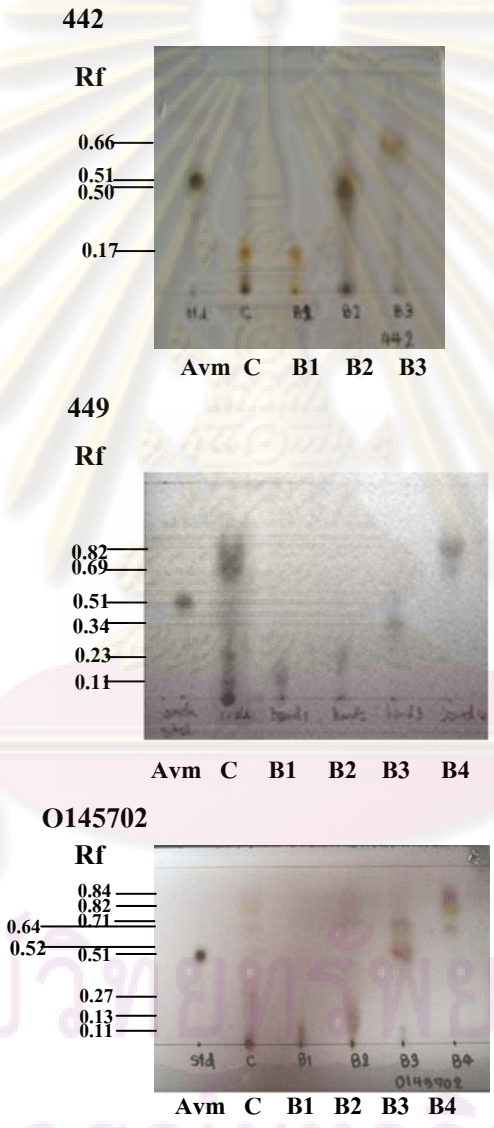


รูปที่ 4.36 ค่า R_f ของสารฆ่าแมลงมาตรฐาน 1. avermectin 2. doramectin 3. ivermectin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8.2.2 ผลการวิเคราะห์โดย Analytical TLC เทียบกับ avermectin

นำสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงแต่ละแถบที่แยกโดย Preparative TLC จากสายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ซึ่งละลายใน เอทิลอะซิเทตเข้มข้น 50 ppm มาหยดลงบนแผ่นซิลิกาเจล แล้วนำแผ่นใส่ลงในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยเอทิลอะซิเทต เปรียบเทียบตำแหน่งของสารที่เคลื่อนที่กับ avermectin พบว่าสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงแต่ละแถบที่แยกได้จาก Preparative TLC ทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้ค่า R_f ที่ต่างจาก avermectin ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.51 ดังแสดงในรูปที่ 4.37



รูปที่ 4.37 ค่า R_f ของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงแต่ละแถบที่แยกได้จาก Preparative TLC จากสายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 เปรียบเทียบกับ avermectin (Avm = avermectin, C = สารสกัดหยาบ และ B1-B4 = แถบที่ 1-4) เมื่อวิเคราะห์โดย Analytical TLC โดยมีเอทิลอะซิเทต เป็น mobile phase

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แต่อย่างไรก็ตามพบว่า แถบที่ 2 จากสายพันธุ์ 442 และแถบที่ 3 จากสายพันธุ์ O145702 มีค่า R_f ใกล้เคียงกับ avermectin ดังนั้นจะทำการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงต่อไป

4.8.2.3 การเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดย Analytical TLC

หยดสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่แยกได้จาก Preparative TLC จากสายพันธุ์ 442 และ O145702 ซึ่งละลายใน เอทิลอะซิเทต ลงบนแผ่นซิลิกาเจล นำแต่ละแผ่นใส่ลงในภาชนะที่อิ่มตัวด้วย mobile phase ดังนี้

ก. เอทิลอะซิเทต (ethyl acetate)

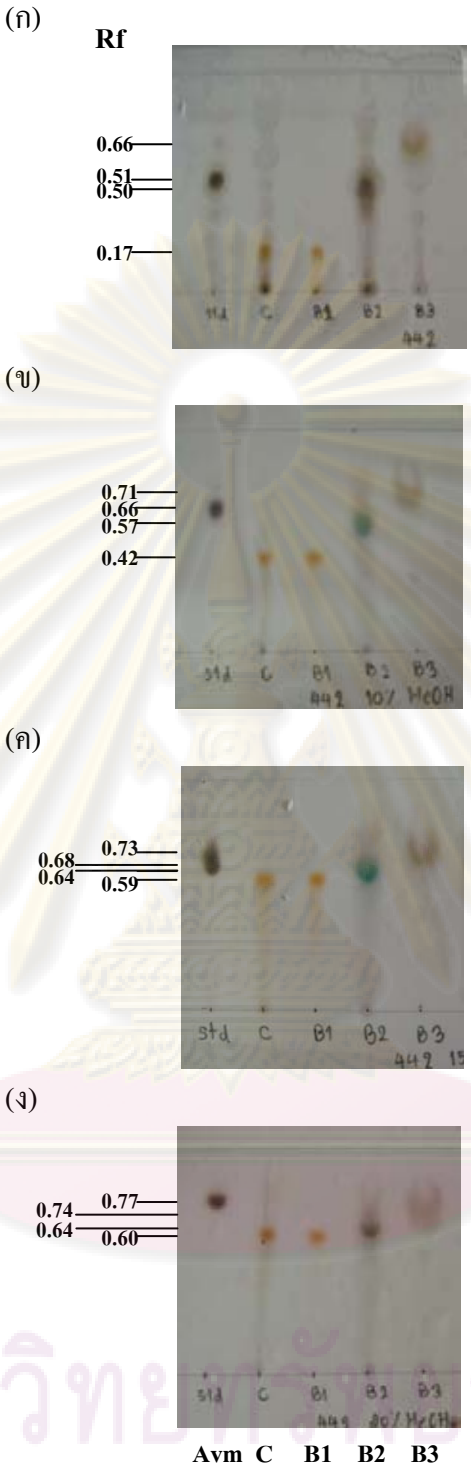
ข. 10% เมทานอล (methanol) : 90% เอทิลอะซิเทต (ethyl acetate)

ค. 15% เมทานอล (methanol) : 85% เอทิลอะซิเทต (ethyl acetate)

ง. 20% เมทานอล (methanol) : 80% เอทิลอะซิเทต (ethyl acetate)

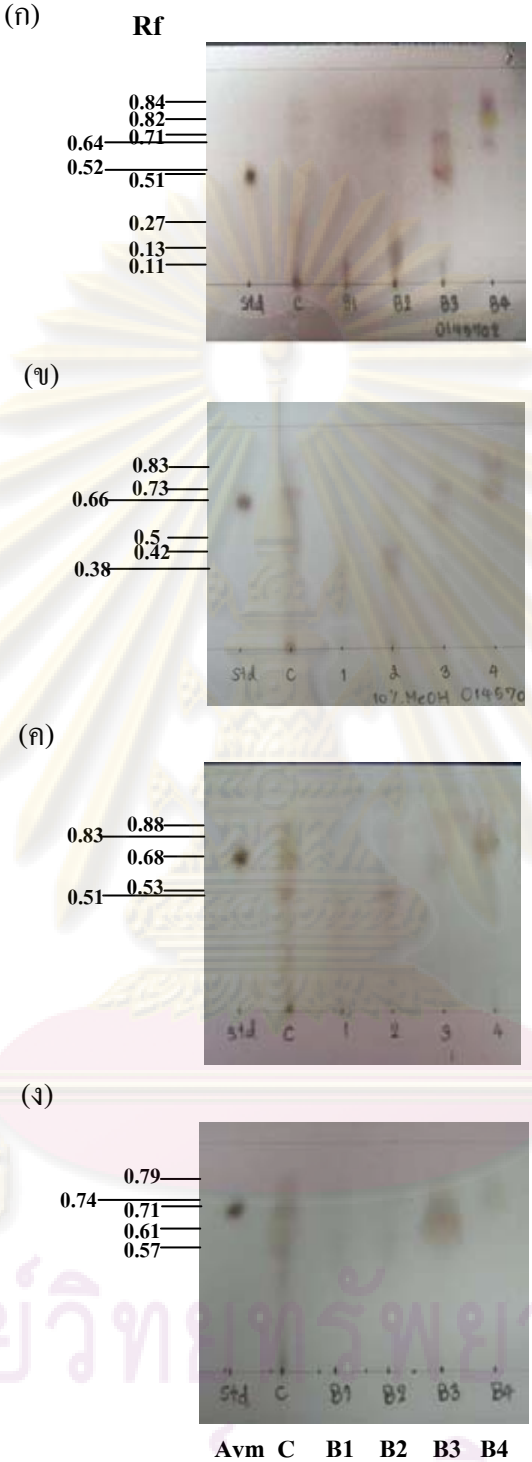
ทำการทดลองตามข้อ 3.3.10.2 แล้วเปรียบเทียบค่า R_f กับ avermectin ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.38 และ 4.39 พบว่าสารทดสอบให้ค่า R_f ที่ต่างจาก avermectin ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจากผลการทดลองที่ 4.8.2.2 และ 4.8.2.3 สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ได้จากสายพันธุ์ทั้ง 3 น่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงชนิดใหม่ที่ไม่ใช่ avermectin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.38 ค่า R_f ของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงแต่ละแถบที่แยกได้จาก Preparative TLC จากสายพันธุ์ 442 วิเคราะห์โดย Analytical TLC โดยมี mobile phase เป็น (ก) เอทิลอะซิเทต (ข) 10% เมทานอล : 90% เอทิลอะซิเทต (ค) 15% เมทานอล : 85% เอทิลอะซิเทต และ (ง) 20% เมทานอล: 80% เอทิลอะซิเทต เปรียบเทียบกับ avermectin (Avm = avermectin, C = สารสกัดหยาบ และ B1-B4 = แถบที่ 1-4)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.39 ค่า R_f ของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงแต่ละแถบที่แยกได้จาก Preparative TLC จากสายพันธุ์ O145702 วิเคราะห์โดย Analytical TLC โดยมี mobile phase เป็น (ก) เอทิลอะซิเทต (ข) 10% เมทานอล : 90% เอทิลอะซิเทต (ค) 15% เมทานอล : 85% เอทิลอะซิเทต และ (ง) 20% เมทานอล: 80% เอทิลอะซิเทต เปรียบเทียบกับ avermectin (Avm = avermectin, C = สารสกัดหยาบ และ B1-B4 = แถบที่ 1-4)

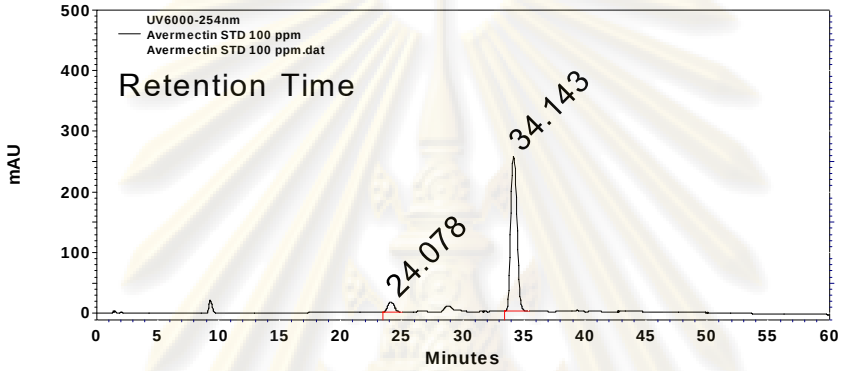
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8.3 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดย High performance liquid1 chromatography (HPLC)

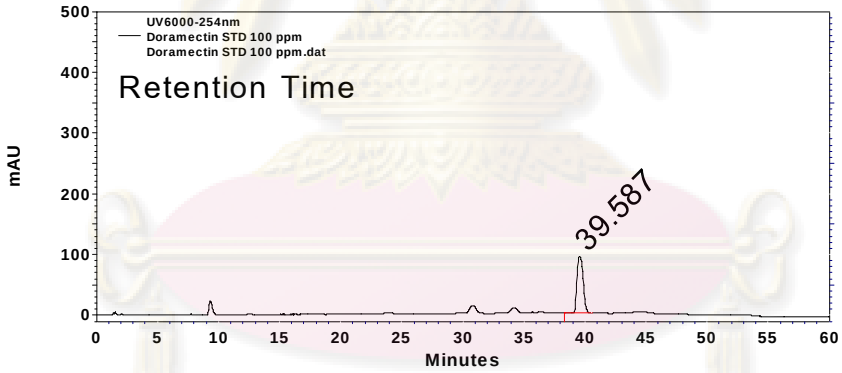
4.8.3.1 การวิเคราะห์สารฆ่าแมลงมาตรฐานโดย HPLC

นำสารละลาย 10 ไมโครลิตร avermectin, doramectin และ ivermectin ซึ่งละลายในเมทานอลที่ความเข้มข้น 50 ppm มาวิเคราะห์โดย HPLC วิธีการทดลองในข้อ 3.3.10.3.3 จากการทดลองพบว่า สารละลาย avermectin, doramectin และ ivermectin ให้ค่า retention time (RT) ที่ 34.143, 39.587 และ 46.132 นาที ตามลำดับ แสดงในรูปที่ 4.40

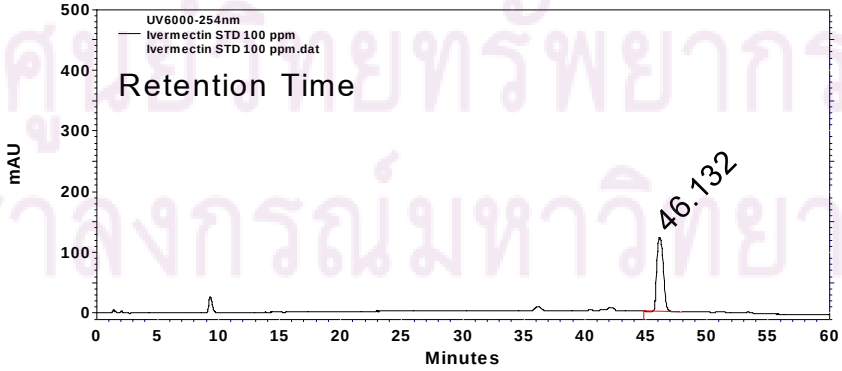
(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 4.40 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานของ (ก) avermectin, (ข) doramectin และ (ค) ivermectin

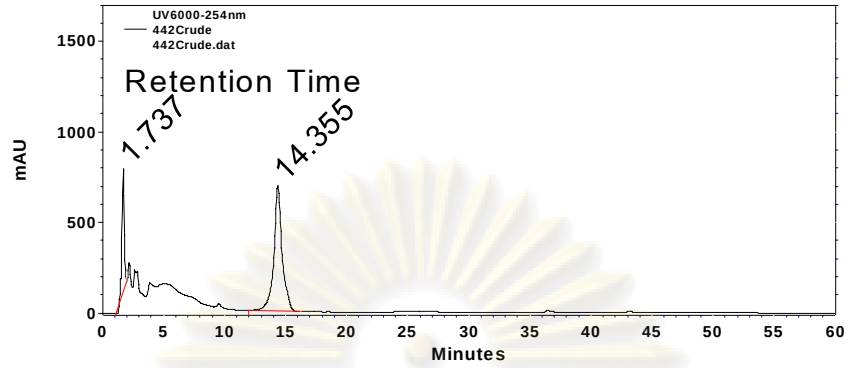
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8.3.2 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่แยกได้จาก Preparative TLC จากสายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 โดย HPLC

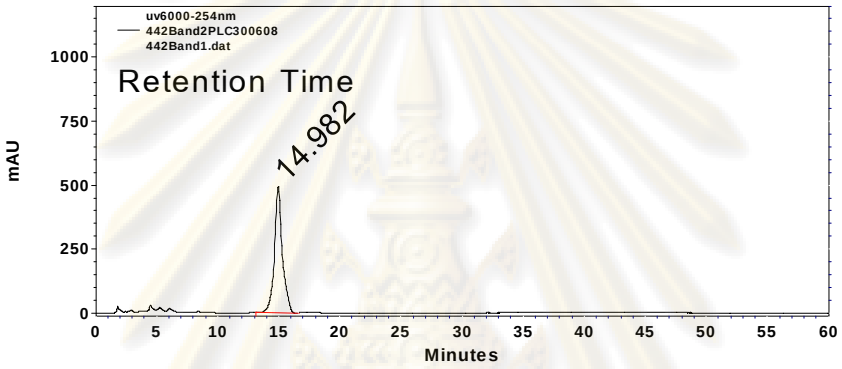
ได้ทดลองนำสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงแต่ละแถบที่แยกได้จาก Preparative TLC จากสายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ละลายในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 50 ppm ปริมาตรสารที่วิเคราะห์ 10 ไมโครลิตรนำมาวิเคราะห์โดย HPLC ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.10.3.3 พบว่า สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงแต่ละแถบที่แยกได้จาก Preparative TLC ทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้ค่า retention time (RT) ที่ต่างจากสารฆ่าแมลงมาตรฐาน avermectin, doramectin และ ivermectin แสดงในรูปที่ 4.41- 4.43 ซึ่งอาจสรุปได้ว่าสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่สกัดได้จากสายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดนี้ เป็นสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงชนิดใหม่ที่ไม่ใช่ avermectin, doramectin และ ivermectin ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย Analytical TLC ข้อ 4.8.2.1 และ 4.8.2.2 นอกจากนี้ยังพบว่าในสายพันธุ์ 442 แถบ 1 ที่แยกได้จาก Preparative TLC เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC แสดงพีคเดี่ยวให้ค่า RT ที่ 14.982 นาที แสดงในรูปที่ 4.41ข และให้ประสิทธิภาพในการฆ่าไรทะเลได้สูงถึง 88.71 % ที่ความเข้มข้นสารสกัด 5 ppm จากผลการทดลองในตารางที่ 4.12 ซึ่งอาจนำไปศึกษาทางเคมีเพื่อหาโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลของสารโดยวิธี NMR และ Mass spectroscopy ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

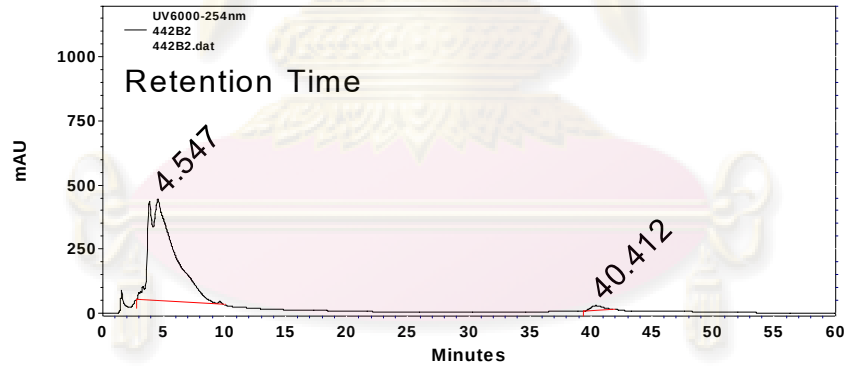
(ก)



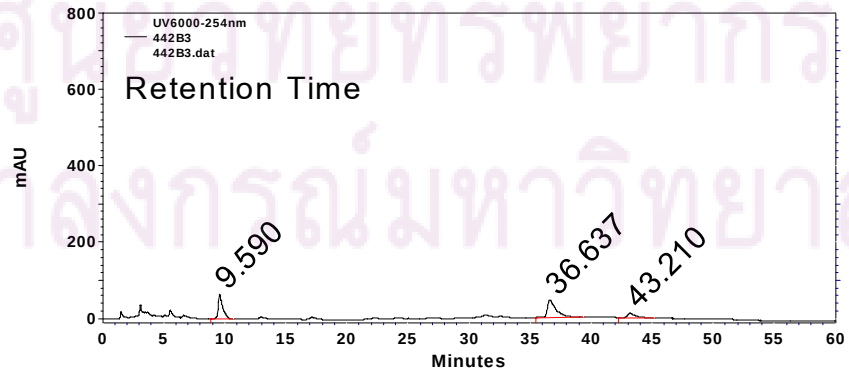
(ข)



(ค)



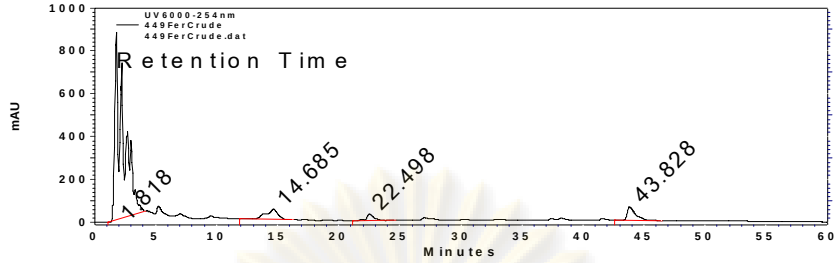
(ง)



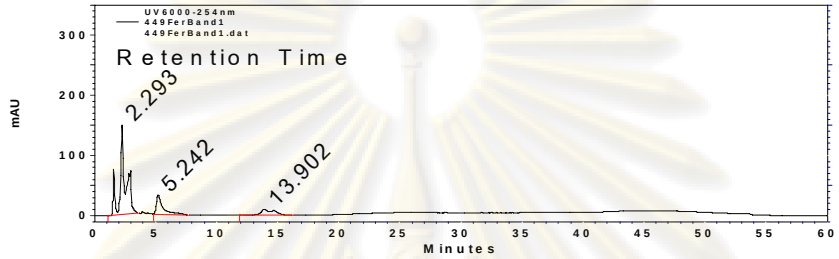
รูปที่ 4.41 โครมาโทแกรมของของ (ก) สารสกัดหยาบ, (ข)- (ง) สารสกัดที่แยกได้ Preparative TLC แถบที่ 1-3 ตามลำดับ จากเชื้อ *Streptomyces* sp. 442

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

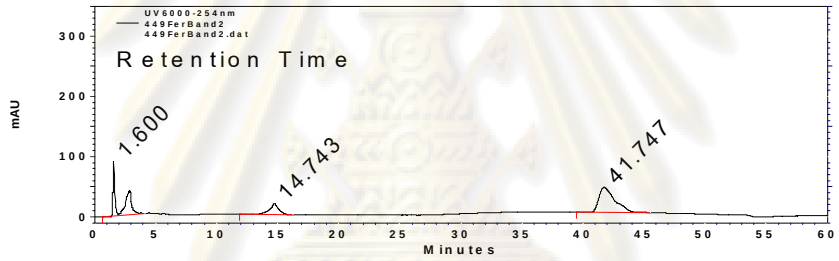
(ก)



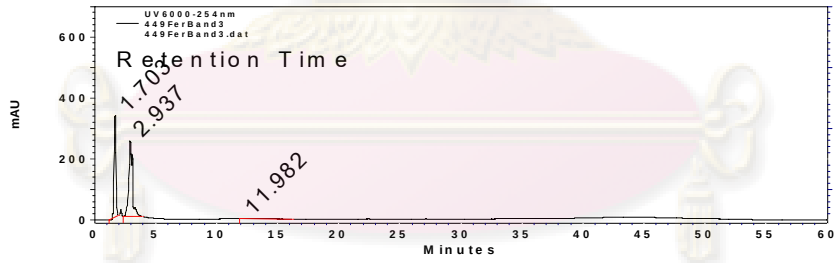
(ข)



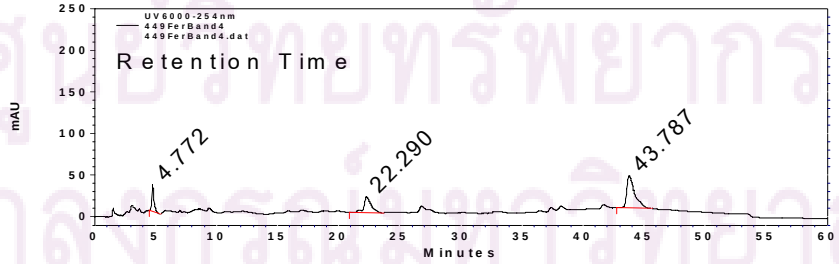
(ค)



(ง)



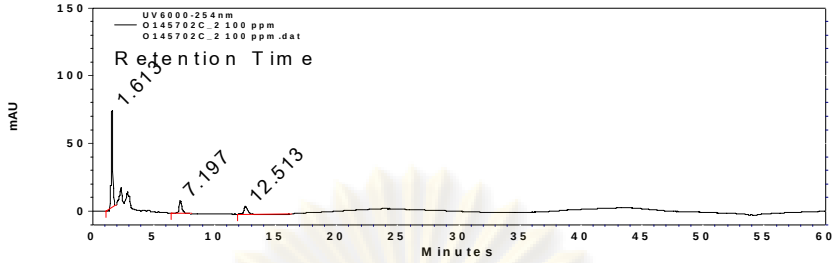
(จ)



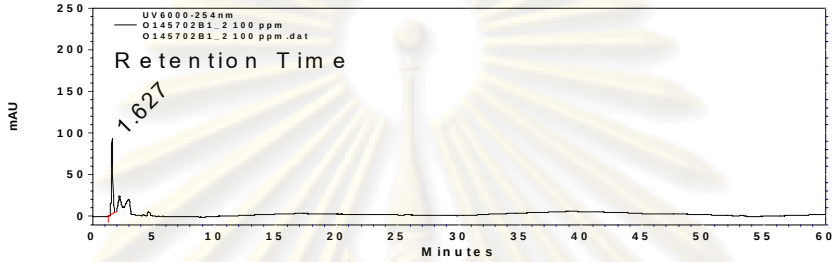
รูปที่ 4.42 โครมาโทแกรมของของ (ก) สารสกัดหยาบ, (ข)-(จ) สารสกัดที่แยกได้จาก Preparative TLC แถบที่ 1- 4 ตามลำดับ จากเชื้อ *Streptomyces* sp. 449

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

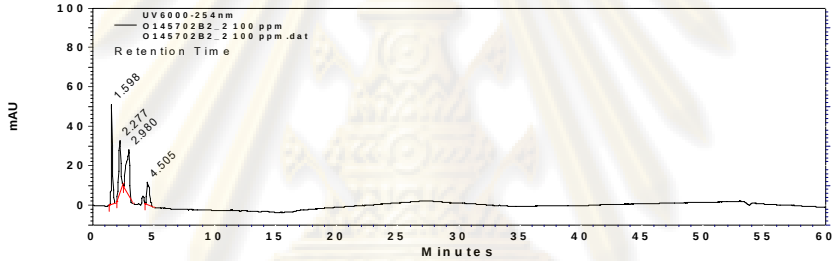
(ก)



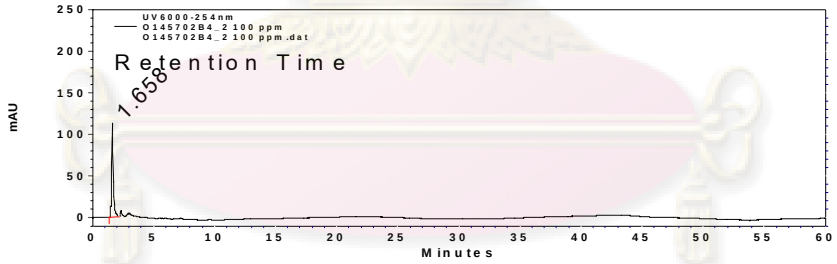
(ข)



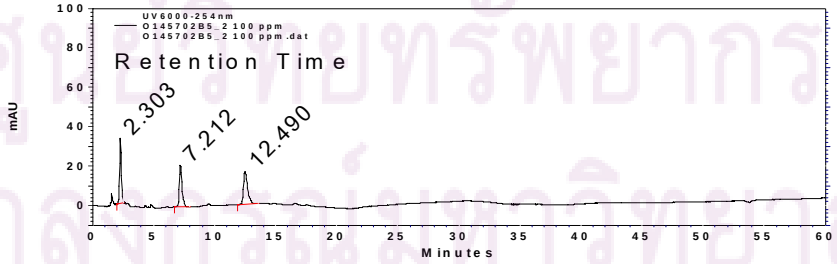
(ค)



(ง)



(จ)



รูปที่ 4.43 โครมาโทแกรมของของ (ก) สารสกัดหยาบ, (ข)- (จ) สารสกัดที่แยกได้จาก Preparative TLC แถบที่ 1- 4 ตามลำดับ จากเชื้อ *Streptomyces* sp. O145702

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจาก *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ซึ่งแยกได้จากดินในประเทศไทย และการทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงทำโดยสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใย ด้วยเอทิลอะซิเทต แล้วทดสอบการฆ่าไรทะเล จากผลการทดลองสรุปภาวะเหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ภาวะเหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702

สายพันธุ์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	อุณหภูมิบ่มเชื้อ (^{o}C)	ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ (วัน)	% การตายของไรทะเล *
442	แป้งมันสำปะหลัง 1.5 % (w/v)	1. สารสกัดยีสต์ เทียบเท่า N 0.025 % (w/v)	30	5	91.16 (25 ppm)
		2. $(NH_4)_2HPO_4$ เทียบเท่า N 0.05 % (w/v)	30	4	70.42 (25 ppm)
449	แป้งมันสำปะหลัง 1.5 % (w/v)	1. สารสกัดยีสต์ เทียบเท่า N 0.075 % (w/v)	30	4	98.58 (5 ppm)
		2. $(NH_4)_2HPO_4$เทียบเท่า N 0.075 % (w/v)	30	4	93.8 (5 ppm)
O145702	แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลสที่ 0.5 % (w/v) ; DE 38%	ไนโตรเจนผสมระหว่างสารสกัดยีสต์ และ KNO_3 เทียบเท่า N 0.074 % (w/v)	30	5	91.5 (50 ppm)

หมายเหตุ * บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตัวเลขในวงเล็บคือความเข้มข้นสารสกัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองที่ได้พบว่า สายพันธุ์ 449 มีประสิทธิภาพสูงสุด ในการผลิตสารฆ่าแมลง รองลงมา ได้แก่ สายพันธุ์ 442 และ O145702 ตามลำดับ

ได้มีผู้รายงานถึงการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จาก *Streptomyces* spp. พบว่า สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรัสโตส ซูโครส แลกโทส มอลโทส กลีเซอรอล เดกซ์ทริน แป้ง แป้งข้าวโพด และแป้งที่ละลายน้ำได้ เป็นต้น (Warr และคณะ, 1994 ; Jonsbu และ คณะ, 2002; Xiong และคณะ, 2004; Gesheva และคณะ, 2005; Zhuang และคณะ, 2006) งานวิจัยนี้ พบว่า เมื่อเลี้ยง *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การออกฤทธิ์ฆ่าแมลงลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคส โดยจะมีผลเพิ่มการเจริญมากกว่าการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง ซึ่งสอดคล้องกับ Jonsbu และคณะ (2002) รายงานว่ากลูโคสยับยั้งการสร้างสาร nystatin และ Inoue (2007) พบว่า กลูโคสยับยั้งการผลิตสาร retamycin งานวิจัยนี้ยังได้แปรชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลทราย, เดกซ์ทริน, แป้งที่สามารถละลายน้ำได้, แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพด แทนการใช้กลูโคส พบว่าในสายพันธุ์ 442 และ 449 แป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ซึ่งให้สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่สูงเมื่อทดสอบสารออกฤทธิ์กับไรทะเล ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Warr และคณะ (1994) ที่รายงานว่า การผลิต milbemycin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม macrolides แปรผันตามชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ โดยถ้าใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ผลผลิตสูงกว่ากลูโคส จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ 442 และ 449 สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งให้เป็นโมเลกุลเล็ก แล้วนำไปใช้ได้ ซึ่งมีรายงานว่า *Streptomyces* sp. NO.4 สามารถสร้างอะไมเลสได้ (Primarini และคณะ, 1999) และ ในปี 2008 Kar และ Ray รายงานว่า *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 ผลิตแอลฟา-อะไมเลสได้ ขณะที่ในสายพันธุ์ O145702 กลับพบว่ามีการเจริญและการออกฤทธิ์ฆ่าแมลงได้น้อยเมื่อเลี้ยงในแป้งมันสำปะหลังแสดงว่า สายพันธุ์ O145702 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ ขณะที่เมื่อใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน กลับเจริญและให้การออกฤทธิ์ฆ่าแมลงได้ดี แต่เนื่องจากเดกซ์ทรินมีราคาสูงจึงได้ทดลองใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลส พบว่าแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลส ที่มีค่า DE เท่ากับ 38 เปอร์เซ็นต์ ให้การออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลได้ดีกว่าเมื่อใช้เดกซ์ทริน ที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

จากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนพบว่า *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442 และ 449 สามารถใช้ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) ซึ่งเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนได้ ให้ผลสอดคล้องกับรายงานอื่นๆ ที่ใช้อนินทรีย์ไนโตรเจนเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น Sujatha และคณะ (2005) เลี้ยง *Streptomyces* sp. BT-408 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี แอมโมเนียมไนเตรท NH_4NO_3 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ

SBR-22 ต้าน *Staphylococcus aureus* ที่มีปริมาณสูงถึง 181 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Yu และคณะ (2008) ทำการเลี้ยง *Streptomyces rimosus* MY02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 6.244 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร พบว่า สามารถสร้างสารที่มีประสทธิภาพต้านเชื้อราได้ดี เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้อินทรีย์ไนโตรเจน เช่น Xiong และคณะ (2004) ใช้สารสกัดจากยีสต์ และเพบโทน 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพสูงจากเชื้อ *Streptomyces* sp. 173 และในปี 2008 Wu และคณะ ทำการเลี้ยง *Streptomyces padanus* PMS-702 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี soybean meal 11.2 กรัมต่อลิตร สามารถสร้างสาร fungichromin ได้สูงถึง 112 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งก็พบว่าสายพันธุ์ 442 และ 449 สามารถใช้สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ในการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงได้ดีเช่นกัน

ส่วนสายพันธุ์ O145702 สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างสารสกัดจากยีสต์กับโพแทสเซียมไนเตรต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง และจากการทดลองพบว่าเมื่อเชื้อใช้ไนโตรเจนจนหมดจะให้ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ฆ่าไรทะเลของสารสกัดเพิ่มสูงขึ้นทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Zhuang และคณะ (2006) ที่กล่าวว่าการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนทำให้การผลิต meilingmycin โดย *Streptomyces nanchangesis* ลดลง ซึ่งเป็นไปได้ว่าการผลิต meilingmycin จะเกิดขึ้นหลังจากมีการใช้กรดอะมิโนหมดไป ซึ่งยังมีรายงานอื่นๆ ที่สนับสนุนว่าการสร้างสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิอื่นๆ จะเกิดขึ้นหลังจากเชื้อมีการใช้ไนโตรเจนหมดไป (Majumdar, 1967; Byrne และ Greenstein, 1986; Cheng และคณะ, 1995 และ Gesheva และคณะ, 2005 เป็นต้น)

จากการหาผลของอุณหภูมิเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ 30 องศาเซลเซียส ให้ประสิทธิภาพการสร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ดี โดยให้เปอร์เซ็นการตายของไรทะลสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกลุ่มของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจาก *Streptomyces* spp. พบว่าอยู่ระหว่าง 28 และ 30 องศาเซลเซียส (Warr และคณะ,1994, Mironov และคณะ, 2003, Xiong และคณะ, 2004, Gesheva และคณะ, 2005 และ Zhuang และคณะ, 2006)

ผลของความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสารสกัดหยาบที่ทำให้ ไรทะเลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนเริ่มต้น (LD_{50}) ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702 ให้

ค่า LD_{50} ที่ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ 10, 3.5 และ 12.5 ppm ตามลำดับ เมื่อทดสอบกับไรทะเล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งสารสกัดเหล่านี้อาจมีค่า LD_{50} ต่ำกว่านี้ ถ้าได้มีการแยกสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงและทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น ดังเช่นรายงานของ Xiong และคณะ (2004) ได้ทดสอบฤทธิ์การฆ่าไรทะเลของ avermectin B1 ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ พบว่า ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.1 ppm สามารถฆ่าไรทะเลได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบกับไรทะเลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการทดลองแยกสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากสารสกัดหยาบโดย Preparative TLC แล้ววิเคราะห์โดย analytical TLC และ HPLC เทียบกับสารมาตรฐาน avermectins พบว่าสารดังกล่าวให้ค่า R_f จาก TLC และค่า retention time จาก HPLC แตกต่างจากสารมาตรฐาน avermectins ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า *Streptomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ สร้างสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงชนิดใหม่ ซึ่งอาจนำมาพัฒนาจนได้สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพดี และมีศักยภาพที่จะผลิตในเชิงอุตสาหกรรมเพื่อทดแทนการนำเข้าสารฆ่าแมลงจากต่างประเทศได้

ข้อเสนอแนะ

1. ในสายพันธุ์ O145702 พบว่า สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ ให้ฤทธิ์ในการฆ่าไรทะเลได้สูงกว่าเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเทต อาจเนื่องจากว่าสารออกฤทธิ์ละลายได้ดีในน้ำ ดังนั้นควรหาภาวะแยกสารที่มีสมบัติเป็น hydrophilic เช่น แยกโดย ion exchange หรือ gel filtration เป็นต้น

2. ควรแยกสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจาก *Streptomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ และทำให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาโครงสร้าง

3. ศึกษาโครงสร้างทางเคมีและน้ำหนักโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ด้วยวิธี NMR และ Mass spectroscopy ต่อไป เพื่อให้ทราบว่าเป็นสารชนิดใหม่หรือไม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กระทรวงเกษตรประกาศว่า DDT เป็นวัตถุอันตรายห้ามใช้ทางการเกษตร [online]. Available from: http: // 210.246.186.28/ard/Show Forums.aspx?id=11 [2008, August 19].

กองกีฏและสัตววิทยา. 2547. คำแนะนำการใช้สารฆ่าแมลงและศัตรูพืช ปี 2547. กรุงเทพมหานคร: สมาคมกีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย.

กรมวิชาการเกษตร. 2549. การใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช 2545-2549. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ณรรฐพล วัลลีย์ลักษณ์. 2531. การประชุมสัมมนาพืชสารฆ่าแมลงในการทำการเกษตร. กรุงเทพมหานคร: จรัญสนิทวงศ์การพิมพ์ จำกัด. หน้า 89-93.

วงชีวิตของ *Streptomyces* spp. [online]. Available from: http://home.hiroshimau.ac.jp/mbiotech/-hosenkin_lab/Strepto-E.html [2008, May 25].

วุฒิกรณ์ รอดความทุกข์. 2538. การใช้สมุนไพรบางชนิดในการกำจัดแมลงศัตรูพืช. การค้นคว้าอิสระ.ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

โศรยา พันธุ์วิริยาพงษ์. 2531. การประชุมสัมมนาพืชสารฆ่าแมลงในการทำการเกษตร. กรุงเทพมหานคร: จรัญสนิทวงศ์การพิมพ์ จำกัด.

สมพร หิรัญรามเดช. 2534. สมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช มนุษย์ และสัตว์ (Pesticides). [online]. Available from: http://www.vet.ku.ac.th/course/malinee/pesticides 4.htm [2008, May 25].

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2519. ยาฆ่าแมลง. กรุงเทพมหานคร: วงศ์สว่างการพิมพ์.

สุภาณี พิมพ์สมาน. 2540. สารฆ่าแมลง. พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.

อารยา จาติเสถียร. 2540. การพัฒนาสารสกัดจากธรรมชาติ เพื่อปราบแมลงศัตรูพืช. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อุทัย เกตุนุติ. 2538. การผลิตและการนำไวรัส นิวเคลียร์โพลี่ฮีโดรซีส ไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการเรื่องเชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย กรมวิชาการเกษตร. หน้า 203-206.

อำนวย อิศรางกูร ณ อยุธยา และอรรณพ ตันสกุล. 2535. เกษตรยั่งยืน เกษตรกรรมกับธรรมชาติ เครื่อข่ายเกษตรกรรมทางเลือก. พระโขนง กรุงเทพมหานคร.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2538. การผลิตและการนำไวรัสนิวเคลียร์โพลี่ฮีโดรซีสไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการเรื่องเชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย กรมวิชาการเกษตร. หน้า 200-202.

ภาษาอังกฤษ

Anisha, G.S., Rojan, P.J., Nicemol, J., Niladevi, K.N. and Prema, P. 2008. Production and Characterization of Partially purified Thermostable α-Galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus* for Food Industrial applications. Food Chemistry. 111(3): 631-635.

Association of Official Analytical Chemists, 1975. Official methods of analysis. 12th ed. Association of Official Agricultural Chemists. Washington, DC.

Aygun, D. 2004. Diagnosis in an acute organophosphate poisoning: report of three interesting cases and review of the literature. Eurpean Journal Emergency Medicine. 11: 55-58.

Baker, G.L., Corry, R.J. and Autor, A.P. 1985. Oxygen Free Radical Induced Damage in Kidneys Subjected to Warm Ischemia and Reperfusion. Annals of Surgery. 202: 628-641.

Basak, K. and Majumdar, S. K. 1973. Utilization of Carbon and Nitrogen Sources by *Streptomyces kanamyceticus* for Kanamycin Production. Antimicromal Agents and Chemotherapy. 4(1): 6-10.

Benimeli, C.S., Fuentes, M.S., Abate, C.M. and Amoroso, M.J. 2008. Bioremediation of Lindane-Contaminate Soil by *Streptomyces* sp M7 and ItsEffects on Zea Mays Growth. Internationnal Biodeterioration and Biodegradation. 61: 233-239.

Bernfeld, P. 1955. Amylases alpha and beta. In: S.P. Colowick and O.N. Kaplan, Editors, Methods Enzymology. 140–146. New York, Academic Press.

Bertassa, M., HolZenkampfer, M., Zeeck, A. Antonia, F. D. and Fiedler, H. P.2001. Bagremy Cin A and B, Novel Antibiotic from *Streptomyces* sp. Tu 4128. Journal of Antibiotics. 54: 730-736.

Brock, T.D. and Madigan, M.T.1991. The Bacteria:Biology of microorganisms, 6th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. 1974. Bergey's Maunal of Determinative Bacteriology. 8th ed.Baltimore; The Williams and Wilkins company. 747-828.

Burg, R.W., Miller, B.M., Baker, E.E. and 12 other authors. 1979. Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. Antimicrob Agents Chemother. 15 : 361-367.

Byrane, K.M. and Greenstein, M. 1986. Nitrogen Repression of Gilvocarcin V Production in *Streptomyces Arenae* 2064. Journal of Antibiotics. 594-600.

Carner, G.R. 1976. A Description of the Lift Cycle of Entamophthora sp. in the two-spotted spider mite. Journal of Invertebrate Pathology. 28: 245-254.

Cummins, C. S. and Harris, H. 1958. Studies on The Cell-Wall Composition and Taxonomy of Actinomycetales and Related Groups. Journal General Microbiology. 18:173.

Cheng, Y.R., Fang,A and Demain, A.L. 1995. Effect of Amino Acids on Rapamycin Biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus*. Applied Microbiology Biotechnology. 43: 1096-1098

Coombs, J.T. and Franco, C.M.M. 2003. Visualization of an Endophytic Streptomyces Species in Wheat Seed. Applied and Environmental Microbiology. 69(7): 4260-4262.

Cowan, S.T. 1974. Cowan & Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambidge, Cambridge University Press.

Dalphin, J.C., Pernet, D., Reboux, G., Martinez, J., Dubiz, A., Barale, T. and Depierre, A. 1991. Influence of Storage and Drying of Fodder on Thermophilic Actinomycete Aerocontamination in Dairy Farms of the Doubs Region of France. Throx. 46(9); 619-623.

Demain, A.L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology. 52: 455-463.

Deshpande, B.S., Ambedkar, S.S. and Shewale, J.G. 1988. Biologically Active Secondary Metabolites from *Streptomyces*. Enzyme Microbiology Technology.10: 455-471.

Elliott, M. 1976. Properties and Applications of Pyrethroids. Environmental Health Perspectives. 14: 3-13.

Elliott, M., Farnham, A.W., Janes N. F., Needham, P. H., Pulman, D. A. and Stevenson, J. H. 1973. A Photostable pyrethroid. Nature. 246 : 169-170.

Engwall, K.S., Conlon, S., Fedechko, R., McArthur, H., Pekrun, K., Chen, Y., Jenne, S., La, C., Trinh, N., Kim, S., Zhang, Y.X., Fox, R., Guatafsson, C. and Krebber, A. 2005. Semi-Synthetic DNA Shuffling of *aveC* Leads to Improved Industrial Scale Production of Doramectin by *Streptomyces avermitilis*. Metabolic Engineering. 7: 27-37.

Ezra, D., Castillo, U.F., Strobel, G.A., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Condron, M.A., Teplow, D.B., Sears, J., Maranta, M., Hunter, M., Weber, B. and Yaver, D. 2004. Coronamycins, Peptide Antibiotics Produced by a Verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) Endophytic on *Monstera* sp. Microbiology. 150(4): 785-793.

Ferron, P., Fargues, J. and Riba, G. 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. In Arora, D.K., Ajello, L. and Mukerji, K.G. Handbook of Applied Mycology. 665-706. Marcel Dekker, New York.

Fuka, J.R. 1998. Environmental Manipulation for Microbial Control of Insects. IN Barbosa, P. (ed), Conservation Biological control, 255-267. USA, Academic Press.

Gallo, M. and Katz, E. 1972. Regulation of Secondary Metabolite Biosynthesis: Catabolite Repression of Phenoxazinone Synthase and Actinomycin Formation by Glucose. Journal of Bacteriology. 109:659-667.

Ganassi, S., Moretti, A., Pagliai, A.M.B., Logrieco, A. and Sabatini, A. 2002. Effects of beauvericin on *Schizaphis graminum* (Aphididae). Journal of Invertebrate Pathology. 80: 90-96.

Gesheva, V., Ivanova, V. and Gesheva, R. 2005. Effect of Nutrients on the Production of AK-111-81 Macrolide Antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. Microbiological Research. 160: 243-248.

Glazer, A.N. and Nikaido, H. 2000. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. Second Edition. Cambridge University Press.

Graigne, M. and Ahmed. 1988. Handbook of Plants with Pest Control Properties. John Wiley and Sons. New York.

Hajek, A.E. and Leger, R.J.St. 1994. Interaction Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. Annual Review of Entomology. 39: 293-322.

Hayashi, K.I., Yamazoe, A., Ishibashi, Y., Kusaka, N., Oono, Y. and Nozaki, H. 2008. Active Core Structure of Terfestatin A, a New Specific Inhibitor of Auxin Signaling. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 16: 5331-5344

Hiraki, J., Ichikawa, T., Ninomiya, S., Seki, H., Uohama, K., Seki, H., Kimura, S., Yanagimoto, Y. and Barnett, J.W.Jr. 2003. Use of ADME Studies to Confirm the Safety of ε-Polylysine as a Preservative in Food. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 37(2): 328-340.

Humber, R.A. 1997. Fungi: Identification. In Lacey, L.A. (ed), Manual of Techniques in Insect Pathology. 153-185. Academic Press, London.

Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M. and Strasser, H. 2001. Use of Hyphomycetous Fungi for Managing Insect Pest. In Butt, T.M., Jackson, C.W. and Magan, N. (eds). Fungi as Biocontrol Agents Progress, Problems and Potential. 23-29. CABI Publishing, UK.

Inoue, O.O., Netto, W.S., Padilla, G. And Facciotti, M.C.R. 2007. Carbon Catabolite Repression of Retamycin Production by *Streptomyces olindensis* ICB 20. Brazilian Journal of Microbiology. 38(1): 58-61.

Jacobson, M. and Crosby, D.G. 1971. Naturally Occurring Insecticides. Marcel Dekker. Inc New York.

Jonsbu, E., McIntyre, M. and Nielsen, J. 2002. The Influence of Carbon Sources and Morphology on Nystatin Production by *Streptomyces noursei*. Journal of Biotechnology. 95: 133-144.

Kar, S. and Ray, R.C. 2008. Statistical Optimization of α-Amylase Production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 Cells in Calcium Alginate Beads Using Response Surface Methodology. Polish Journal of Microbiology. 57(1): 49-57.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. and Hopwood, D.A. 2000. General Introduction to Actinomycete Biology, p. 2-33. In Practical Streptomyces Genetics. The John Innes Foundation, Norwich.

Kim, H.S. and Park, Y.I. 2008. Isolation and Identification of a Novel Microorganism Producing the Immunosuppressant Tacrolimus. Journal of Bioscience and Bioengineering. 105: 418-421.

Lankas, G. R. and Gordon, L. R. 1989. Toxicology. In Campbell, W. C., ed. Ivermectin and Abamectin. Springer Verlag, New York.

Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. and Marinelli F. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek. 78: 399-405.

Lee, J.Y., Hwang, Y.S., Kim, S.S., Kim, E.S. and Choi, C.Y. 2000. Effect of a Global Regulatory Gene, *afsR*2, from *Streptomyces lividans* on Avermectin Production in *Streptomyces avermitilis*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 89(6): 606-608.

Lewis, G.C., Heard, A.J., Bredy, B.L. and Minter, D.W. 1981. Fungal Parasitism of the Eriophyid mite vector of Ryegrass Mosaic virus. Proceedings 1981 British Crop Protection Conference-Pests and Diseases. 101-111.

Lewer, P., Graupner, E.L.C.P.R., Gilbert, J.R. and Peacock, C. 2003. Tartrolone C: A Novel Insecticidal Macrodiolide Produced by *Streptomyces* sp. CP1130. Journal Natural products. 66: 143-145.

Liang, J., Xu, Z., Liu, T., Lin, J. and Cen, P.2008. Effects of Cultivation Conditions on the Production of Natamycin with *Streptomyces gilvosporeus* LK-196. Enzyme and Microbial Technology. 42: 145-150.

Liechtenstein, E. P., Thomas, W., Fuhremann and Kenneth, R. S. 1971. Persis and Vertical Distribution of DDT, Lindene and Aldrin Residues, 10 and 15 Years After a Single Soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 19(4) : 718-721.

Loebenstein, R.J., 1994, The materials flow of arsenic in the United States: U.S. Bureau of Mines Information Circular 9382. 12

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 267-275.

Macherla, V.R., Liu, J., Bellows, C., Teisan, S., Nicholson, B., Lam, K.S. and Potts, B.C. 2005. Glaciapyroles A, B and C, Pyrrolosesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. Isolated from an Alaskan Marine Sediment. Journal of Nat Products. 68(5): 780-783.

Maimala, S., Tartar, A., Boucias, D. And Chandrapatya, A. 2002. Detection of Toxin Hirsutellin A from *Hirsutella thompsonii*. Jornal of Invertebrate Pathology. 80: 112-126.

Majumdar, M.K. and Majumdar, S. K. 1967. Utilization of Carbon and Nitrogen- containing Compounds for Neomycin Production by *Streptomyces fradiae.* Applied Microbiology. 15(4): 744-749.

Martin, M.C., Manteca, A., Castillo, M.L., Vazquez, F. and Mendez, F.J. 2004. *Streptomyces albus* Isolated from a Human Actinomycetoma and Characterized by Molecular Techmiques. Journal of Clinical Microbiology. 42(12): 5957-5960.

Martins, R., Fernandez, N., Berires, R. and Vasconcelos, V. 2007. Toxicity Assessment of Crude and Partially Purified Extracts of Marine *Synechocystis* and *Synechococcus* Cyanobacterial Strains in Marine Invertebrates. Toxicon. 50: 791-799.

Milner, R.J. 2000. Current Status of *Metarrhizium* As A Mycoinsecticide in Australia. Biocontrol News and Information. 21: 47-50

Mironov, V.A., Sergeeva, A.V., Gavrilina, A.V. and Danilenko, V.N. 2003. Dependence of the Composition of the Avermectin Complex of *Streptomyces avermitilis* on the Glucose Content in the Medium. Applied Biochemistry and Microbiology. 39:183-187.

Mitsuhashi, J., Grace, T.D.C. and Waterhouse, D.F. 1970. Effects of Insecticides on Cultures of Insect Cells. Entomologia Experinentalis et Applicata. 13: 327-341.

Nakano, T., Miyake, K., Ikeda, M., Mizukami, T. and Katsumata, R. 2000. Mechanism of the incidental production of a melanin-like pigment during 6-demethylchlortetracycline production in *Streptomyces aureofaciens*. Applied and Environmental Microbiology. 66: 1400-1404.

Nikolakopoulou, T.L., Egan, S., van Overbeek, L.S., Guillaume, G., Heuer, H., Wellington, E.M., van Elsas, J.D., Collard, J.M., Smalla, K. and Karagouni, A.D. 2005. PCR Detection of Oxytetracycline Resistance Genes *otr*(A) and *otr*(B) in Tetracycline-Resistant Streptomycete Isolates from Diverse Habitats. Current Microbiology. (4): 211-216.

Noel, R.K., John, G. and Holt, D.H. 1983. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1st ed. Williams & Wilkins. Baltimore.

Ouyang, L., Tu,G.Q. and Gao, Y.S. 1996. Meilingmycin Production Process of *Streptomyces nanchangensis* sp. by Fermentation. Chinese Patent. 228: 1070.

Pandey, A.,Sh,A. and Ma, S.K. 2005. Utilization of Carbon and Nitrogen Sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the Production of an Anti Bacterial Antibiotic. Afican Journal of Biotechnology. 4: 909-910.

Peng, K.C., Huang, H.S., Tzeng, Y.M. and Liu, S.Y. 2005. Circular Dichroism Analysis of Destruxins from *Metarhizium anisopliae*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 62: 41-50.

Pereira, R., Medeiros Y.S. and Frode, T.S. 2006. Antiinflammatory effects of Tacrolimus in a mouse model of pleurisy. Transplant Immunology. 16: 105-111.

Pfaller, M.A. 2006. Flavophospholipol Use in Animals: Positive Implications for Antimicrobial Resistance Based on Its Microbiologic Properties. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 56(2): 115-121.

Primarini, D. and Ohta, Y. 1999. Some Enzyme Properties of Raw Starch Digesting Amylases from *Streptomyces* sp.No.4. Laboratory of Microbial Biochemistry,Hiroshima University.

Quintero, J.C., Moreira, M.T., Feijoo, G. And Lema, J.M. 2005. Effect of Surfactants on the Soil Desorption of Hexachlorocyclohexane (HCH) Isomers and Their Anaerobic Biodegradation. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 80: 1005-1015.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Registration Eligibility Decision Document: *Bacillus thuringiensis*; EPA-738-R-98-004; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, March 1998.

Rintala, H. 2003. Streptomycetes in Indoor Environments-PCR Based Detection and Diversity. Doctor thesis. Environmental Sciences Program. University of Kuopio. Finland

Sahin, E. 2005. Antimicrobial Activity of *Stretomyces* Species Against Mushroom Blotch Disease pathogen. Basic Microbiology. 45(1): 64-71.

Samson, R.A., Evans, H.C. and Latge, J.P. 1988. Atlas of Entomophathogenic Fungi. Springer-Verlag, Berlin. 187 .

Schimana, J., Fiedler, H. P., Groth, I., Submuth, R., Beil, W., Walker, M. and Zeeck, A. Simocyclinones, Novel Cytostatic Angucyclinone Antibiotics Produced by Streptomyces antibioticus Tu 6040. Journal of Antibiotics. 2000.53: 779-787.

Schwartz, D., Berger, S., Heinzelmann, E., Muschko, K., Welzel, K. and Wohlleben, W. 2004. Biosynthetic Gene Cluster of the Herbicide Phosphinothricin Tripeptide from *Streptomyces viridochromogenes* Tu 494. Applied and Environmental Microbiology. 70(12):7093-7102.

Seelanan, P., Srisa-art, M., Petsom, A. and Nhujak, T. 2006. Determination of Avermectin in Commercial Formulations Using Microemulsion Electrokinetic Chromatography. Analytica Chimica Acta. 570: 8-14.

Shi, Y.F. 2000 . Advances of Insecticidical Microorganisms. Plant Protection. 26:32-34.

Singh, S.B., Zink, D.L., Herath, K.B., Salazar, O. and Genilloud, O. 2008. Discovery and Antibacterial Activity of Lucensimycin C from *Streptomyces lucensis*. Tetrahedron Letters. 49: 2616-2619.

Sowemimo, A.A., Fakoya, F.A., Awopetu, I., Omobuwajo, O.R. and Adesanya, S.A. 2007. Toxicity and Mutagenic Activity of Some Selected Nigerian Plants. Journal of Ethnopharmacology. 113: 427-432.

Sujatha, P., Raju, K.V.V.S.N. and Ramana, T. 2005. Studies on a New Marine Streptomycete BT-408 Producing Polyketide Antibiotic SBR-22 Effective against methicillin Resistant *Staphylococus aureus*. Microbiological Research. 160: 119-126.

Sujitwanit, A., Chunthong, P., Piluk, J., Tantithanagorngul, W., Tolieng, V., Palaga, T., Sangvanich, P., Petsom, A. and Pinphanichakarn, P. 2007. Screening for Insecticide-Producing *Streptomyces* Isolates from Thai Soil. The 19th Annual Meeting of the Thai

Society for Biotechnology “TSB2007: Biotechnology for Gross National Happiness”. 245-250.

Taechowisan, T., Tuntiwachwuttikul, P., Lu., C., Shen, Y., Lumyong, S. and Taylor, W.C. 2007. Anti-Inflammatory Activity of 4-Arylcoumarins from Endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. Immunological Investigations. 36(2): 203-211.

Tanabe, T., Morinaga, K., Fukamizo, T. and Mitsutomi, M. 2003. Novel Chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with Transglycosylation Activity. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 67(2): 354-364.

Vey, A., Quiot, J.M., Mazet, I. and McCoy, C.W. 1993. Toxicity and Pathology of Crude Broth Filtrate produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* in Shake Culture. Journal of Invertebrate Pathology. 61: 131-137.

Vining, L.C. 1990. Functions of Secondary Metabolites. Annual Review of Microbiology . 44: 395-427.

Warr, S.R.C., Box, S.J., Burbidge, C., Edwards, H. and Jones, J.J. 1994. Milbemycin Production by *Streptomyces* sp.: The Effect of Carbohydrates. Journal of Industrial Microbiology. 13:43-48.

Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. and Bhole, B.D. 2001. How Many Antibiotics are Produced by the Genus *Streptomyces* sp. Archives of Microbiology. 176(5): 386-390.

Weinzierl, R., Henn, T., Koehler, P.G. and Tucker, C.L. 1995. Microbial Insecticides. University of Florida.

Wislocki, P.G., Grosso, L.S. and Dybas, R.A. 1989. Environmental Aspects of Abamectin Use in Crop Protection. In Campbell, W.C., ed. Ivermectin and Abamectin. 10-146. Springer Verlag, New York.

Wood, H.A. and Hughes, P.R. 1996. Recombinant Viral Insecticides: Delivery of Environmentally Safe and Cost-Effective Products. Entomophaga. 41: 361-373.

Wu, J.Y., Huang, J.W. and Shih, H.D. 2008. Optimization of Cultivation Conditions for Fungichromin Production from *Streptomyces padanus* PMS-702. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers. 39:67-73

Xiong, L., Li, J. and Kong, F.2004. *Streptomyces* sp.173, An Insecticidal Micro-Organism form Marine. Letters in Applied Microbiology. 38:32-37.

Yin, P., Wang, Y.H., Zhang, S.L. Chu, J., Zhuang, Y.P. and Wu, Y.B. 2008. Effect of mycelial morphology on bioreactor performance and avermectin production of *Streptomyces avermitilis* in submerged cultivations. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers. 1-7.

Yu, J., Liu, Q., Liu, X., Sun, Q. Yan, J., Qi, X. and Fan, S. 2008. Effect of Liquid Culture Requirements on Antifungal Antibiotic Production by *Streptomyces rimosus* MY02. Bioresource Tectnology. 99: 2087-2091.

Zhang, X., Chen, Z., Li, M., Wen, Y., Song, Y. and Li, J. 2006. Construction of Ivermectin Producer by Domain Swaps of Avermectin Polyketide Synthase in *Streptomyces avermitilis*. Applied Genetics and Molecular Biotechnology. 72:986-994

Zhuang, Y.P., Chen, B., Chu, J. and Zhang, S. 2006. Medium Optimization for Meilingmycin Production by *Streptomyces nanchangensis* Using Response Surface Methodology. Process Biochemistry. 41: 405-409.

Zhou, C.N. 2001. A Progress and Development Foresight of Pesticidal Microorganisms in China. Pesticides. 40: 8-10.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ แข็งสำหรับกระตุ้นการสร้างสปอร์

ถั่วเหลืองบด	2.0	เปอร์เซ็นต์
วุ้นผง (agar)	2.0	เปอร์เซ็นต์
Mannitol	2.0	เปอร์เซ็นต์

น้ำปลอดประจุ (deionized water) และน้ำประปาในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน (ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก Luria-Bertani (LB)

กลูโคส	0.1	เปอร์เซ็นต์
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	เปอร์เซ็นต์
โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)	0.38	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.2	เปอร์เซ็นต์
น้ำปลอดประจุ	1000	มิลลิลิตร
กรณีอาหารแข็งจะเติมผงวุ้น (agar)	1.5	เปอร์เซ็นต์

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจาก Luria-Bertani ที่เติม แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส (38%DE)

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส	13.0	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	เปอร์เ ซ็นต์
โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)	0.38	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.2	เปอร์เซ็นต์
น้ำปลอดประจุ	1000	มิลลิลิตร
อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน		

การย่อยแป้งมันด้วย BAN® 480 L (บริษัท NOVO)

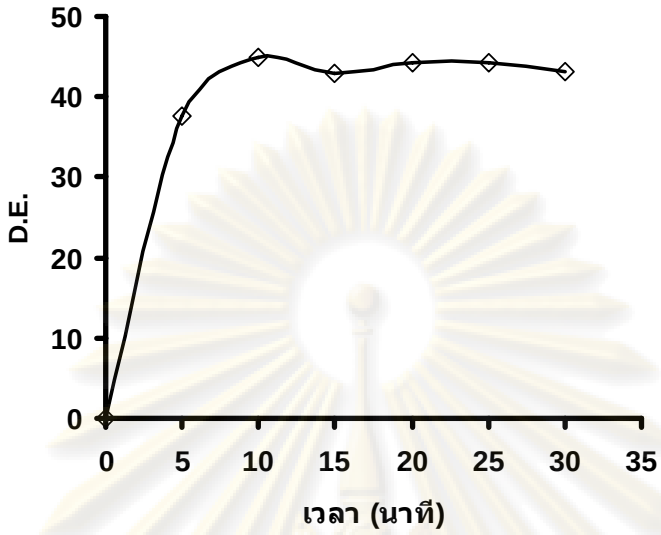
แป้งมันสำปะหลัง	0.5	กิโลกรัม
น้ำ	1.0	ลิตร
BAN 480L	0.165	มิลลิลิตร (เทียบเท่ากับ 95 KNU)

โดย BAN 480L อยู่ในรูปของเหลวมีความหนาแน่น 1.2 กรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณเอนไซม์ 480 KNU/g

1 KNU = one Kilo Novo alpha-amylase Unit สามารถย่อยแป้งได้ 5.26 กรัม

วิธีการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

นำแป้งมันสำปะหลังผสมน้ำละลายให้เข้ากัน เติมเอนไซม์อะไมเลส กวนผสมให้เข้ากันบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่นาทีที่ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, และ 120 นาที ทำการหยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง เก็บเอาเฉพาะส่วนใส นำไปหาปริมาณน้ำตาล (ภาคผนวก ค หมายเลข 3) หาน้ำหนักแห้ง และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเดกซ์โตรสอิคริวาเลนท์ (% DE) (ภาคผนวก ค หมายเลข) ซึ่งแสดงค่า %DE ที่ได้ในรูปที่ ข.1



รูปที่ ข.1 แสดงค่า %DE. ของแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยอะไมเลสที่เวลาต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

1. การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1951)

สารเคมี

สารละลาย ก สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 2 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย ข สารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 0.2 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน ปรับให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

สารละลาย ค สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 0.1 กรัมในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

สารละลาย ง ผสมสารละลาย ก 98 มิลลิลิตรกับสารละลาย ข 1 มิลลิลิตร และสารละลาย ค 1 มิลลิลิตร (เตรียมเมื่อทำการทดลองเท่านั้น)

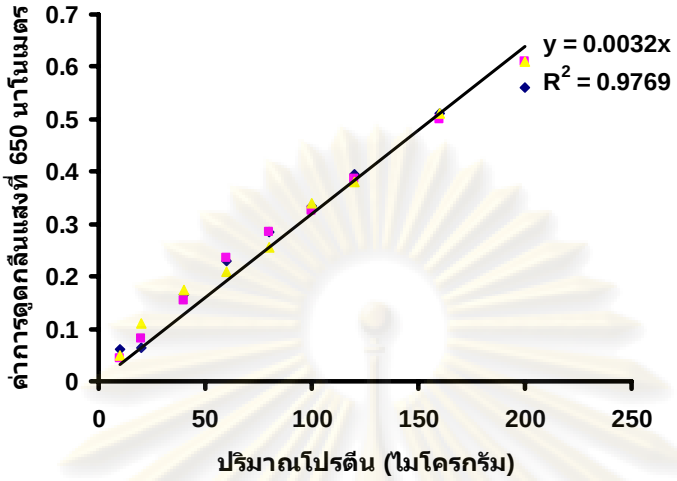
สารละลาย จ สารละลายโฟลินฟีนอล (Folin phenol reagent) ทำการเจือจางในน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 (เตรียมเมื่อทำการทดลองเท่านั้น)

วิธีการวิเคราะห์

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.1มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย ง 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย จ 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวเปรียบเทียบ เทียบหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างได้จากกราฟมาตรฐานโปรตีน แสดงในรูปที่ ค.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟมาตรฐานโปรตีน



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานโปรตีน

2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

นำตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร เติม 1.2 N HCl 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที รอให้เย็น นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (reducing sugar) โดยวิธี DNSA (ภาคผนวก ค หมายเลข 3)

3. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (reducing sugar) โดยวิธี DNSA (Bernfeld, 1955)

สารเคมี

1. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำขจัดไอออน 50 มิลลิลิตร และเติมโพแทสเซียมทาร์เทรต 30 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำขจัดไอออน เก็บในขวดสีชา

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน ปิดปากหลอดทดลอง นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็น

3. เติมน้ำขจัดไอออน 10 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสมในข้อ 2 ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

4. ทำ blank โดยใช้น้ำขจัดไอออนแทนสารละลายตัวอย่าง แล้วนำไปทำการทดลองเช่นเดียวกันกับสารละลายตัวอย่าง

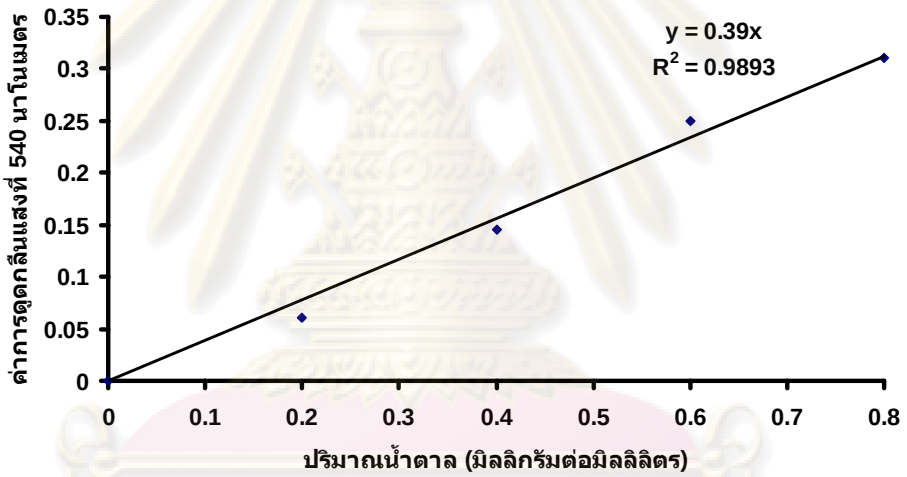
5. เทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0 -0.1 กรัมต่อลิตร

การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 1 กรัมต่อลิตร

2. เจือจางให้ได้ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 กรัมต่อลิตร

3. นำไปทำการทดลองเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่าง แล้วนำไปเขียนกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส แสดงในรูปที่ ค.2



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

4. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl protein, A.O.A.C., 1975)

ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม สำหรับเซลล์ หรือดูดปริมาตร 1 มิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างน้ำหมัก ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วยโปรแตสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟตอัตราส่วน 95:5 ลงไปจำนวน 7 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนสารละลายใส เป็นเวลา 45 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปประกอบเข้ากับเครื่องกลั่นไนโตรเจน และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50-60 มิลลิลิตร หรือจนสารละลายเป็นสีดำ แล้วกลั่นจับก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายบอริก

เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติมอินดิเคเตอร์ 3 หยด ซึ่งเป็นเมทิลเรดเมทิลลีนบลู (methyl red methylene blue) กลั่นจนสารละลายบอริกมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่กลั่นได้มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตแล้วคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน หรือปริมาณโปรตีน

เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน = (ปริมาตรกรดเกลือ x ความเข้มข้นกรดเกลือ x 1.4)/ น้ำหนักแห้ง
เปอร์เซ็นโปรตีน = เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน x 6.25

การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1N

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 M (1 N) = 40 กรัม
ถ้าสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N = (40 x 0.1X/1 = 4 กรัม
นำสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

4.2 การเตรียมสารละลาย Potassium hydrogen phosphate (KHP)

KHP มีมวลโมเลกุล (M.W.) 204.23
ดังนั้นสารละลาย KHP 0.1 N จะมีสาร KHP อยู่ = 0.1 x 204.23 = 20.423 กรัม ลายสาร KHP 20.4 กรัม ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 1 ลิตร หรือหากต้องการเตรียมสารละลาย KHP 25 มิลลิลิตร ต้องละลายสาร KHP 0.51 กรัม

4.3 การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

โดยนำสารละลาย KHP ที่เตรียมได้จากข้อ.2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ฟีนอฟทาลีน (Phenophthalein) ลงไป 3 หยด จากนั้นนำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 เมื่อถึงจุดยุติ สารละลายในฟลาสก์จะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต แล้วคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนี้

N ของ NaOH = (ปริมาตรของ KHP x 1000)/M.W. x ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไทเทรต

4.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 N

เตรียมจากกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 37% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

โดย HCl 1 ลิตร = 1.19 กิโลกรัม

ความหนาแน่น = มวล/ปริมาตร = 1.19 กิโลกรัม/1000 มิลลิลิตร; 1 มิลลิลิตร = 1.19 กรัม

น้ำหนักโมเลกุลของ HCl = 36; 1N = 36 กรัม

1 N HCl มีเนื้อ HCl อยู่ = 36 กรัม

ถ้า 0.1 N HCl มีเนื้อ HCl อยู่ = 36 x 0.1 = 3.6 กรัม

แต่ในการเตรียม ต้องเตรียมจาก HCl 37%

เนื้อสาร HCl 37 กรัม มาจากสารละลาย HCl = 100 กรัม

ถ้าเนื้อสาร HCl 3.6 กรัม มาจากสารละลาย HCl = 100 x 3.6/37 = 9.7297 กรัม

HCl 1190 กรัม มาจากสารละลาย HCl = 1000 มิลลิลิตร

ถ้า HCl 9.7297 กรัม มาจากสารละลาย HCl = 100 x 9.7297/1190 = 8.1762 มิลลิลิตร

ดังนั้นในการเตียมสารละลาย 0.1 N HCl ปริมาตร 1 ลิตร ต้องดูด HCl เข้มข้น 37% มาปริมาตร 8.1762 มิลลิลิตร ละลายในน้ำบริสุทธิ์ 1 ลิตร

4.5 การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก 0.1 N

โดยนำ HCl 0.1 N ที่เตรียมจากข้อ 3.4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร มาไทเทรตกับ 0.1 N NaOH ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจากข้อ 3.3 โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู โดยสูตรคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ HCl ดังนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นที่แน่นอนของสาร NaOH

V_1 = ปริมาตรของสาร NaOH ที่ใช้ไทรต

N_2 = ความเข้มข้นที่แท้จริงของ HCl ที่ต้องการทราบ

V_2 = ปริมาตรของ HCl ที่นำมาไทเทรต

4.6 การเตรียมสารละลายกรดบอริก (Boric acid) 4 %

ละลายกรดบอริก 40 กรัมในน้ำบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 ลิตร อาจใช้ความร้อนช่วยในการละลาย

4.7 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40%

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 400 กรัม ในน้ำบริสุทธิ์ ปรับปริมาตร 1 ลิตร

4.8 การเตรียมอินดิเคเตอร์ (Mixed Indicator)

นำ methyl red 0.001 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 10 มิลลิลิตร และนำ bromcresol green 0.001 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายทั้งสองมาผสมกัน ในอัตราส่วน 1:5

5. วิเคราะห์หาปริมาณเดกซ์โตรสอิควิวาเลนท์ (% DE) ในตัวอย่างน้ำตาลที่ได้จากแป้งมันที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส

อุปกรณ์และสารเคมี

1. หลอดแก้วขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร
2. ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
3. ลูกยางดูดสารเคมี
4. Spectrophotometer รุ่น Spectronic 21
5. ตู้อบไฟฟ้า
6. DNSA Reagent
7. Rack (ที่ใส่หลอดทดลอง)
8. หม้อต้มน้ำเดือด
9. เตาไฟฟ้า สำหรับต้มน้ำเดือด

วิธีการทดลอง

1. ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างน้ำตาลที่ได้จากแป้งมันที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส เอาส่วนใสมาใช้
2. ดูดน้ำตาลที่กรองแล้วมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้ว ขนาด 16x150 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร
3. ผสมน้ำตาลกับน้ำให้เข้ากัน โดยใช้ปิเปตอันใหม่ดูดสารละลายขึ้นมาในปิเปต แล้วปล่อยใส่ในหลอด ทำเช่นนี้หลายๆ เที่ยว จนเห็นว่าน้ำตาลเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำแล้ว
4. ดูดสารละลายจากหลอดแก้วนี้ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้วหลอดที่สอง ซึ่งมีน้ำอยู่ 9 มิลลิลิตร เช่นกัน แล้วใช้ปิเปตอันใหม่ดูดผสมน้ำตาลกับน้ำให้เป็นเนื้อเดียวกัน

5. ดูดสารละลายจากหลอดที่สอง ลงในหลอดที่สาม ซึ่งมีน้ำอยู่ 4 มิลลิลิตร ผสมน้ำตาลกับน้ำให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ปิเปตอันใหม่ ดูดสารละลายในหลอดที่สาม ขึ้นมาแล้วปล่อยลงในหลอดอย่างเดิมเช่นนี้ หลายๆ เที่ยว
6. ดูดสารละลายน้ำตาลจากหลอดที่สาม 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วเปล่าๆ และดูดน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วเปล่าอีกหลอดหนึ่ง จากนั้นดูดสารเคมีที่ชื่อว่า DNSA 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วที่มีน้ำตาล 1 มิลลิลิตร และดูด DNSA 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วที่มีน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เช่นกัน เขย่าหลอดแก้วที่มีน้ำกับ DNSA และน้ำตาลกับ DNSA ให้สารทั้ง 2 ชนิดผสมกัน นำหลอดแก้วนี้ต้มในหม้อต้มที่มีน้ำกำลังเดือดอยู่ต้มอยู่นาน 5 นาที จึงนำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
7. ดูดน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแล้วที่ต้มและทำให้เย็นแล้ว ปิดหลอดแก้วด้วยพาราฟิล์ม เขย่าหลอดแก้วให้น้ำผสมกับสารจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อคิดเป็นค่าน้ำตาลรีดิวซิ่ง แล้วนำค่านี้มาหารด้วย น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร) และคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็น

วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์เดกซ์โตรสอิคริวาเลนท์

$$\text{เปอร์เซ็นต์เดกซ์โตรสอิคริวาเลนท์ (\% DE)} = \frac{\text{ค่าน้ำตาลรีดิวซิ่ง x 100\%}}{\text{น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร)}}$$

6. การทำให้เซลล์แตกด้วยความถี่คลื่นเสียง (ultrasonics)

นำ culture ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วนเส้นใย (Mycelium) ออกจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (Broth) นำส่วนเส้นใยล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นนำส่วนเส้นใยมาใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยความถี่คลื่นเสียงด้วยเครื่อง Ultrasonic disruption เป็นเวลา 12 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกเอาเฉพาะส่วนใสไปวิเคราะห์หาจากปริมาณโปรตีนจากเซลล์โดยวิธี Lowry (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) ต่อไป

ภาคผนวก ง

1. คำนวณร้อยละไนโตรเจนในสูตรอาหารดัดแปลง LB โดยวิธีเจลดาห์ล

สูตรคำนวณ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ) = $\frac{XxNx1.4x100}{W}$

X= Vol. of acid titration

N= normality of acid

W= weight of sample

Yeast extract

Yeast extract 0.13 g ใช้ HCl ในการไทเทรต = 10.7 ml

$$\frac{10.7 \times 0.1002 \times 1.4}{0.13} = 11.5461$$

Yeast extract 0.12 g ใช้ HCl ในการไทเทรต = 8.6 ml

$$\frac{8.6 \times 0.1002 \times 1.4}{0.12} = 10.0534$$

Yeast extract 0.10 g ใช้ HCl ในการไทเทรต = 7.8 ml

$$\frac{7.8 \times 0.1002 \times 1.4}{0.10} = 10.9418$$

เฉลี่ย Yeast extract มีร้อยละไนโตรเจน = 10.8471

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ดัดแปลงคือ yeast extract และ โพแทสเซียมไน- เตรท (KNO_3) ซึ่งเป็นอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนตามลำดับ จากการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl พบว่า yeast extract มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 10.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และโพแทสเซียมไนเตรทมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 13.86 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เมื่อคำนวณจากสูตรโครงสร้างทางเคมี โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ดัดแปลงใช้ yeast extract 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังนั้นมีปริมาณไนโตรเจนจาก yeast extract อยู่ 0.0217 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และใช้โพแทสเซียมไนเตรท 0.38 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังนั้นมีปริมาณไนโตรเจนจากโพแทสเซียมไนเตรท อยู่ 0.0527 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังนั้นปริมาณไนโตรเจนจากอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ดัดแปลงเท่ากับ 0.074 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

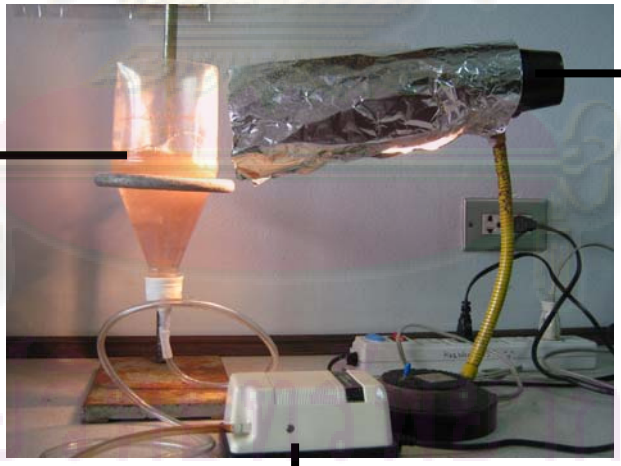
2. สัดส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณเทียบเท่ากับไนโตรเจนรวม 0.074%

สารสกัดจากยีสต์		KNO_3		$(NH_4)_2HPO_4$		%N
% (w/v)	%N	% (w/v)	%N	% (w/v)	%N	ทั้งหมด
0.05	0.006	0.50	0.068	0.325	0.068	0.074
0.10	0.011	0.46	0.063	0.30	0.063	0.074
0.20	0.022	0.38	0.052	0.25	0.052	0.074

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

รูปที่ จ.1 ชุดกรองสปอร์ของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ 442, 449 และ O145702



รูปที่ จ.2 อุปกรณ์การเพาะเลี้ยงไรทะเล (Brine shrimp)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววารุณี ตันติธนากรกุล เกิดเมื่อวันพฤหัสบดีที่ 4 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2525 ที่กรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2547 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิตในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยา ในปีการศึกษา 2548

การเสนอผลงานวิจัย

Tantithanagorngul, W., Sujitwanit, A., Chunthong, P., Piluk, J. Tolieng, V., Petsom, A., Palaga, T. and Pinphanichakarn, P. Effect of Carbon Source on Insecticidal Activity of *Streptomyces* Strains 442, 449 and O145702. Poster presentation and proceedings. 268-273 and Screening for Insecticide-Producing *Streptomyces* Isolates from Thai Soil. Poster presentation and proceedings. 245-250 in The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2007: Biotechnology for Gross National Happiness”., 9-12 October 2007, Thammasat University, Pathumthani, Thailand.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย