บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การสำรวจประสิทธิภาพความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆ ทั้งหมด 27 สายพันธุ์ ที่มีต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กในระยะ 1-2 สามารถจำแนกออกมาได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis kurstaki*, *Bacillus thuringiensis entomocidus* และ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* ซึ่งทั้งสามสายพันธุ์มีลำดับของยีนที่สร้างผลึกโปรตีนเหมือนกัน คือ CryIA และมีรูปร่างของผลึกโปรตีนเป็นแบบ bipyramid เหมือนกันด้วย (Yamamoto and Powell, 1993)

การศึกษาประสิทธิภาพของสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่และหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก โดยการผสมลงในอาหารเทียมและในรวงรังผึ้งซึ่งในการทดลองทุกครั้งจะนำตัวหนอนให้อดอาหาร 2-3 ชั่วโมง เพื่อป้องกันหนอนไม่กินอาหาร สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองเป็นการเพาะเลี้ยงจากสูตรอาหาร NBSG (Nutrient broth supplement with salt and glucose) เนื่องจากเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* และ ทำให้มีการสร้างสปอร์ ซึ่งจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียนี้พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* entomocidus มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 3.049×10^{11} สปอร์ต่อกรัม, *Bacillus thuringiensis dendrolimus* เท่ากับ 8.292×10^{11} สปอร์ต่อกรัม และ Bacillus thuringiensis kurstaki เท่ากับ 1.751×10^{12} สปอร์ต่อกรัม โดยที่เชื้อแบคทีเรียได้จากการทำแห้งโดยใช้เครื่อง lyophilyzer เพราะสามารถเก็บเชื้อไว้ได้นาน เนื่องจากการทำวิจัยครั้งนี้จะต้องใช้ระยะเวลาในการทำนาน ซึ่งขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของตัวหนอนที่นำมาใช้ในการทดลอง ทำให้ไม่สามารถกำหนดระยะเวลาที่แน่นอนได้ วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการเก็บเชื้อไว้ได้นานและมีประสิทธิภาพ

การศึกษาอัตราการตายของหนอนที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เนื่องจากหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งไม่มีพฤติกรรมในการกินอาหารตลอดเวลา แต่มีลักษณะการกินแบบกัดกินเมื่อหนอนอิ่มก็จะหยุดการกินอาหารทำให้การได้รับเชื้อแบคทีเรียต้องใช้เวลา และระยะเวลาของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ 1-2 ใช้เวลา 5 วัน ระยะ 3-4 ใช้เวลา 5 วัน และหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ ระยะ 1-2 และ 3-4 ใช้เวลาเท่ากับ 5 และ 3 วัน การศึกษาที่ระยะเวลาดังกล่าวนี้เพื่อให้หนอนมีการพัฒนาจากระยะหนึ่งไปสู่อีก

ระยะหนึ่ง การที่หนอนมีการลอกคราบจากระยะหนึ่งไปสู่อีกระยะหนึ่งเป็นช่วงที่หนอนมีความอ่อนแอที่สุด และเชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าทำลายได้ง่ายที่สุด

การศึกษาความเป็นพิษพบว่าการใช้อาหารเทียมและแผ่นรังผึ้ง *Bacillus thuringiensis* แต่ละสายพันธุ์ให้ผลที่เหมือนกันคือ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* จะมีความเป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ 1-2 และ 3-4 สูงที่สุดโดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.25 (0.21-0.31) และ 0.51 (0.35-0.70) จากการทดลองในอาหารเทียม และค่า LC_{50} เท่ากับ 2.72 (1.67-5.75) และ 11.51 (4.98-63.03) จากการทดลองในรวงรังผึ้ง ส่วน *Bacillus thuringiensis entomocidus* จะมีความเป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ในระยะ 1-2 และ 3-4 สูงที่สุด ค่า LC_{50} เท่ากับ 0.17 (0.14-0.20) และ 0.48 (0.41-0.54) จากการทดลองในอาหารเทียม และค่า LC_{50} เท่ากับ 0.07 (0.02-0.17) และ 0.18 (0.07-0.33) จากการทดลองในรวงรังผึ้งที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 5.1-5.4) ซึ่งสามารถบอกได้ว่าการตายของหนอนขึ้นอยู่กับชนิดของแมลง Jaquest และคณะ (1986) ทำการศึกษาพบว่ามีปัจจัยอย่างน้อย 3 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ δ-endotoxin คือ สายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตสารพิษ, การย่อยสลายผลึกโปรตีนของน้ำย่อยในกระเพาะของแมลง และความไวภายในตัวของแมลงต่อสารพิษ การผลิตผลึกโปรตีนของ *Bacillus thuringiensis* ขึ้นอยู่กับชนิดของยีน ซึ่งยีนที่ผลิตผลึกโปรตีนของ *Bacillus thuringiensis entomocidus* ได้แก่ยีน CryIA(a), CryIB และ CryIC จากการทดสอบความเป็นพิษของผลึกโปรตีนที่สร้างขึ้นโดยยีน CryIC ต่อหนอนผีเสื้อ 5 ชนิด พบว่าค่า LC_{50} ที่มีต่อหนอน *Pieris brassicae* เท่ากับ 6.0 μg/ml, หนอน *Manduca sexta* เท่ากับ >128 ng/cm^2 หนอน *Heliothis virescens* เท่ากับ >256 ng/cm^2, หนอน *Mamestra brassicae* เท่ากับ 22 ng/cm^2 และ หนอน *Spodoptera litoralis* เท่ากับ 104 ng/ cm^2 ในขณะที่ *Bacillus thurigiensi dendrolimus* มียีนที่ผลิตผลึกโปรตีนคือ cryIA (Hofte and Whiteley, 1989) และขนาดของ plasmids ของ *Bacillus thuringiensis entomocidus* เท่ากับ 52 MDa ขณะที่ *Bacillus thuringiensis* var. *dendrolimus* เท่ากับ 33-73 MDa (Aronson et al., 1986)

จากการทดลองพบว่าหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งระยะ1-2 มีอัตราการตายของหนอนสูงกว่าหนอนระยะ 3-4 โดยค่า LC_{50} ของหนอนระยะ 1-2 ต่ำกว่าหนอนระยะ 3-4 ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า ขนาด อายุ และความแข็งแรงของตัวหนอนมีผลต่ออัตราการตาย และยังพบว่ามีหนอนที่ไม่ยอมกินอาหาร โดยการสร้างใยห่อหุ้มลำตัวและขึ้นมาอยู่บนฝากล่องที่ใช้ในการทดลอง มีขนาดเล็กลง เนื่องจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ไปทำลายเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหนอนทำให้หนอนไม่สามารถกินอาหารได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Van der Laan และคณะ (1982) โดยรายงานว่า *Bacillus thuringiensis* จะมีผลต่อหนอนในระยะเริ่มต้นคือ จะไปยับยั้งการกินอาหารของหนอน

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กและหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ มีเปอร์เซนต์ที่ลดลงเมื่อความเข้มข้นสูงไป โดยที่ความเข้มข้น 0.3 % ของ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และ *Bacillus thuringiensis entomocidus* ในหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก จะไม่พบการเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย และหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้น 0.1% ของ *Bacillus thuringiensis entomocidus* ก็จะไม่พบหนอนเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย เนื่องจาก *Bacillus thuringiensis* มีผลต่อการพัฒนาของตัวหนอนระยะต่างๆ และเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย Afifi และ Matter (1968) ได้ทำการศึกษาผลของ *Bacillus thuringiensis* ต่อตัวหนอน *Anagasta kahniella* พบว่า การเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยลดลง และการพัฒนาของหนอนแต่ละระยะใช้เวลานานขึ้น และยังพบว่า *Bacillus thuringiensis* ทำให้หนอนผีเสื้อ *Spodoptera litoralio* มีน้ำหนักและอัตราการกินอาหารลดลงด้วย

ได้มีการศึกษา *Bacillus thuringiensis galleriae* 11-67 สามารถผลิตสารพิษที่มีผลต่อแมลง 2 ชนิด ซึ่งขณะที่เป็น protoxin โปรตีนมีมวลโมเลกุล = 130 kDa แต่เมื่อถูกย่อยเป็น toxin จะได้โปรตีนมวลโมเลกุล = 65 kDa 2 ตัว คือ negative component และ positive component โดยที่ negative component จะมีพิษต่อหนอน *Cymantria dispar* ซึ่งมีค่า LC_{50}=1.0 µg/g ส่วน positive component จะมีพิษต่อหนอน *Galleria mellonella* โดยจะไปยับยั้งการกินอาหารของตัวอ่อนได้ 100% ที่ความเข้มข้น 2 µg/g (Chestukhina et.al.,1988)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับของ amino acid ตรงบริเวณ N-terminal ปรากฏว่า amino acid ตรงบริเวณ N-terminal ของ negative component จะเหมือนกับลำดับ amino acid ตรงบริเวณ N-terminal ของ δ-endotoxin ของ *Bacillus thuringiensis kurstaki* 65% (ไม่ homologous)แต่ amino acid ตรง N-terminal ของ positive component จะเหมือนกับ amino acid ตรง N-terminal endotoxin ของ *Bacillus thuringiensis israetensis, Bacillus thuringiensis sandiego* ซึ่ง *Bacillus thuringiensis israelansis* มีพิษต่อ แมลงในกลุ่ม Coleoptera ส่วน *Bacillus thuringiensis sandiego* มีความเป็นพิษต่อแมลงในกลุ่ม Diptera จะเห็นได้ว่า *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆ สามารถผลิต δ-endotoxin ได้เหมือนกัน แต่ลักษณะโครงสร้างของ endotoxin มีความแตกต่างกันรวมทั้ง endotoxin ที่สร้างขึ้นมาจะมีความเป็นพิษ ต่อแมลงที่แตกต่างกัน (Chestukhina et.al., 1988) การที่ *Bacillus thuringiensis* แต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะต่อหนอนแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน ขึ้นกับขนาดของผลึกโปรตีนหลังจากที่ถูกน้ำย่อยในกระเพาะอาหารย่อยแล้ว

เพื่อป้องกันการเป็นพิษต่อผึ้งจากการทดลองใน *Bacillus thuringiensis* ในแต่ละสายพันธุ์ต่อหนอนผึ้ง อายุ 3 วันพบว่าที่ความเข้มข้น 10% โดยการผสมลงในรอยัลเยลลี่ไม่พบว่ามีความเป็นพิษต่อหนอนผึ้งในแต่ละสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Cantwell และคณะ (1966) ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารจุลินทรีย์ Certan ต่อผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) โดยวิธีผสมในน้ำหวานให้ตัวเต็มวัยของผึ้งกิน พบว่า Certan ไม่ก่อให้เกิดโรคกับผึ้งอย่างมีนัยสำคัญใน 1 สัปดาห์ แต่การใช้สารพิษ exotoxin ของ *Bacillus thuringiensis* ในปริมาณ 2.5 มิลลิกรัมต่อผึ้งหนึ่งตัว พบอัตราการตายของผึ้งเกือบ 100 % ใน 7 วัน ขณะที่ผลิตภัณฑ์ Certan ผึ้งได้รับ 6.0×10^7 สปอร์ต่อผึ้งหนึ่งตัว จะไม่พบการตายของผึ้งอย่างมีนัยสำคัญใน 9 วัน และอัตราการตายเกือบ 100 % ใน 11 วัน การใช้ผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้ผึ้งตายหลังจาก 8 วัน ผลึกโปรตีนที่บริสุทธิ์ไม่ทำให้ผึ้งตายและยับยั้งการกินอาหารของผึ้ง เนื่องจาก *Bacillus thuringiensis* มีความจำเพาะเจาะจงสูง จึงไม่มีการทำลายแมลงนอกเป้าหมายโดยเฉพาะแมลงคนละอันดับ(Order) เพราะฉะนั้นเมื่อมีการนำไปใช้ในการควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งในหีบเลี้ยงผึ้งก็จะไม่เป็นอันตรายต่อหนอนผึ้งซึ่ง Ali และคณะ (1973) รายงานการใช้ *Bacillus thuringiensis* ในแผ่นรังผึ้งสามารถป้องกันการเข้าทำลายของของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งได้นานถึง 6 เดือน เนื่องจาก สปอร์ของแบคทีเรียสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 2-3 ปี และอาจจะเจือปนในน้ำผึ้ง เพราะฉะนั้นการควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งโดยวิธีนี้ จะต้องมีความรอบคอบและไม่ใช้ความเข้มข้นที่สูงเกินไป เพื่อป้องกันการเจือปนในน้ำผึ้ง แต่เนื่องจาก *Bacillus thuringiensis* มีความปลอดภัยต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมนุษย์ เมื่อเทียบกับการใช้สารเคมีแล้ว นับว่ามีความปลอดภัยสูงกว่าการใช้สารเคมีมาก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย