บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างดินเพื่อที่จะนำมาแยกเชื้อ Bt นั้น เนื่องจากว่าตามธรรมชาติทั่วไปมีโอกาสพบเชื้อ Bt ได้ทุกแห่งไม่ว่าจะเป็นใน แมลง สัตว์ ใบไม้หรือบนต้นไม้ แต่สุดท้ายแล้วก็จะโดนชะล้างตกลงสู่พื้นดิน ดังนั้นแหล่งของเชื้อ Bt ส่วนใหญ่จึงอยู่ในดิน โดยที่สปอร์ของเชื้อ Bt สามารถคงอยู่ในดินได้มากกว่า 1 ปี และงอกสู่ระยะ vetgetative ได้ถ้ามีการกระตุ้นด้วยสิ่งเร้าต่าง ๆ เช่น เกิดสภาวะ pH ที่เป็นกลางในพื้นที่นั้น ๆ (De Lucca *et al.*, 1981) ส่วนสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำนั้น มีโอกาสพบเชื้อ Bt ได้น้อย ซึ่ง Menon and De Mestral (1985) รายงานว่า ในน้ำกลั่นและน้ำประปาหลังจากผ่านไป 20 วัน จะพบเชื้อ Bt ที่อยู่รอดเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำที่มาจากทะเลสาบน้ำจืด ประชากรของเชื้อ Bt ยังคงที่ เมื่อเวลาผ่านไป 50 วัน และในน้ำทะเล ประชากรของ Bt จะลดลงไป 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากผ่านไป 30 วัน ดังนั้นความเป็นไปได้ที่จะพบเชื้อ Bt ที่อยู่ในดินจึงมีมากกว่า และในการเก็บตัวอย่างดินนั้นได้เลือกพื้นที่ที่ทำการเก็บดิน โดยเลือกพื้นที่ที่ไม่มีการทำการเกษตรอยู่ในขณะนั้น หรือเป็นพื้นที่ที่ไม่เคยมีประวัติในการทำการเกษตรมาก่อน เพราะเนื่องจากว่าถ้าเป็นพื้นที่ที่มีการทำการเกษตร โอกาสที่เกษตรกรจะพ่นเชื้อ Bt เพื่อป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชมีอยู่สูง ถ้าเก็บดินในพื้นที่ดังกล่าว ก็จะได้ isolate ที่เป็น Bt การค้า ไม่ใช่ isolate ที่มีอยู่ตามธรรมชาติจริง

จากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากในอำเภอต่าง ๆ ของจังหวัดเชียงใหม่ เมื่อตรวจสอบลักษณะของดินที่สามารถทำการแยกเชื้อ Bt ออกมาได้มากนั้น พบว่าดินมีลักษณะร่วนซุย ในเนื้อดินมีอินทรีย์วัตถุอยู่สูง ส่วนดินเหนียวหรือดินปนทราย พบเชื้อ Bt อยู่น้อยมากหรือไม่พบเลย และลักษณะดินที่ไม่สามารถแยกเชื้อ Bt ออกมาได้ เป็นดินลูกรังหรือดินที่มีหินปะปนอยู่มากและเนื้อดินแห้งมีความชื้นอยู่ในเนื้อดินต่ำมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของเพ็ญลักษณ์ และคณะ (2546) และ Theunis *et al.* (1998) ซึ่งพบว่า สามารถแยกเชื้อ Bt ได้มาจากดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง ในทำนองเดียวกัน Martin and Travers (1989) ได้รายงานว่า สภาพพื้นที่ที่มีลักษณะเป็นหาดทราย ทะเลทราย หรือดินที่อยู่ในชั้นดินลึก ๆ พบ Bt ได้น้อยมาก และจากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อ Bt isolate บาง isolate ที่ได้ มีการสร้างผลึกโปรตีนมากกว่า 1 รูปแบบแสดงเป็นเชื้อ Bt ที่มี gene ที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนมากกว่า 1 gene (Aronson *et al.*, 1986) จึงทำให้เชื้อ Bt สามารถสร้างผลึกโปรตีนได้มากกว่า 1 รูปแบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการทดสอบประสิทธิภาพของ Bt isolate นั้นเชื้อ Bt ที่ใช้นำมาทดสอบต้องเลี้ยง ให้เจริญจนถึงช่วง free spore คือเป็นระยะที่ สปอร์และผลึกโปรตีนหลุดออกมาจากเซลล์ เพื่อให้เชื้อ Bt มีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเกิดพิษกับแมลง นั่นคือผลึกโปรตีนพร้อมที่เปลี่ยนรูปเป็นสารพิษ เมื่อเข้าไปอยู่ในตัวแมลง ซึ่งผลการตายของหนอนที่ชัดเจนเนื่องจากเชื้อ Bt อยู่ที่ประมาณ 3 วัน เพราะถ้าใช้เชื้อ Bt ที่ยังไม่อยู่ในช่วง free spore เมื่อเข้าไปอยู่ในตัวแมลง เชื้อ Bt จะใช้เวลาในการเจริญต่ออีกระยะหนึ่งเพื่อทำการพัฒนาให้กลายเป็นสปอร์และผลึกโปรตีนที่สมบูรณ์ ทำให้ระยะเวลาที่จะทำให้หนอนตายเพิ่มขึ้นไปอีก 1-2 วันหรือหนอนอาจไม่ตายเลย เนื่องจากว่าหนอนมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนวัยมีความแข็งแรงพอที่จะต้านทานต่อเชื้อ Bt ได้ ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ Bt ที่แยกได้มาจากดินจำเป็นต้องมีการทำทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้น (preliminary screening test) ก่อน เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกรวดเร็วในการตรวจสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของ Bt isolate กับแมลงอาศัย แต่เพื่อความถูกต้องของผลการตรวจสอบต้องทำการทดสอบอย่างน้อยที่สุด isolate ละ 2 การทดลอง (Attathom *et al*., 1996; Chang *et al*., 1998; Porcar and Caballero, 2000) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นจำนวน 3 ครั้ง ครั้งแรกใช้เชื้อ Bt ปริมาณมากคือ 4 loopfull เพราะต้องการคัดเลือกเชื้อ Bt ที่มีความสามารถในการฆ่าหนอนได้จริง ส่วนในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 จะใช้ปริมาณเชื้อแค่ 1 loopfull เพราะต้องการคัดเลือกเชื้อ Bt ที่มีความรุนแรงในการฆ่าหนอน เนื่องจากการใช้เชื้อ Bt ปริมาณน้อยยังสามารถฆ่าหนอนได้ ก็สามารถนำไปศึกษาวิจัยต่อทำเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชต่อไปได้ในอนาคต และจากผลการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 ในเชื้อ Bt isolate เดียวกันมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนแตกต่างกัน เนื่องจากว่ามีเชื้อ Bt isolate ที่จะทดสอบมาก จึงต้องใช้ปริมาณหนอนในการทดลองมาก บางครั้งหนอนในรุ่น F2 มีไม่พอทำการทดลอง ต้องใช้หนอนรุ่น F3 นำมาทดลอง ดังนั้นความแข็งแรงของหนอนจึงไม่เท่ากัน หนอนที่แข็งแรงกว่าสามารถต้านทานต่อเชื้อ Bt ได้ดีกว่าหนอนที่อ่อนแอ สาเหตุอีกประการหนึ่งที่สำคัญคือเป็นการทดสอบโดยใช้เชื้อเคลือบผิวหน้าของก้อนอาหารเทียม ซึ่งหนอนแต่ละตัวมีพฤติกรรมการกินอาหารไม่เหมือนกัน หนอนบางตัวกัดแทะกินบริเวณผิวหน้าของอาหารเทียมไปรอบ ๆ จนหมดก้อน ทำให้ได้รับปริมาณเชื้อเข้าไปมาก แต่บางตัวกัดกินเข้าไปในกลางก้อนอาหาร เมื่อมีการให้อาหารเพิ่มหนอนจะย้ายไปกินอาหารใหม่ ทำให้ได้รับปริมาณเชื้อเข้าสู่ร่างกายได้น้อย ดังนั้นเหล่านี้จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ Bt isolate เดียวกันในการทดลองแต่ละครั้งมีความแตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของผลึกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผลที่ได้มักพบว่าการที่โปรตีนชนิดเดียวแยกเป็นหลาย ๆ แถบใน SDS-PAGE มักเกิดจากการใช้ SDS ที่ไม่บริสุทธิ์ มีสารพวก C_{10}, C_{14} และ C_{14} alkyl sulfates เจือปนอยู่ นอกจากนี้การได้ผลที่แตกต่างไปจากเดิมที่ควรเป็นมักเกิดจากการใช้ reagent ที่คุณภาพไม่ดี ดังนั้นเพื่อให้การแยกโปรตีนมีคุณภาพสูงเหมือนกับทุกครั้งต้องใช้ acrylamide ที่มีความบริสุทธิ์สูง และสารต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับเตรียม buffer ก็ต้องเป็น analytical grade จากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของผลึกโปรตีนของ Bt แต่ละ isolate พบว่ามีความสัมพันธ์กับรูปแบบของผลึกโปรตีน กล่าวคือ Bt ทุก isolates ยกเว้น Bt subsp. *israelensis* จะสร้างผลึกโปรตีนรูป bipyramid เพียงรูปแบบเดียว เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 130-138 กิโลดาลตัน ซึ่งแสดงว่าเป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม Cry1 (Aronson *et al*., 1991) เช่นเดียวกับที่ Chilcott and Wigley (1994) รายงานว่า เชื้อ Bt ที่ผลิตผลึกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงดังกล่าวนี้ถูกกำหนดการสร้างด้วยยีนในกลุ่ม *cry* 1 พบได้ในเชื้อ Bt หลาย subspecies เช่น *kurstaki, aizawai, sotto, berliner* และ *kenyae* เป็นต้น ซึ่งมีประสิทธิภาพในการฆ่าตัวอ่อนของแมลงในอันดับ Lepidoptera สอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าหนอนกระทู้หอมของ isolate cm-f2(6), cm-jt2(7), cm-ss4(5) และ cm-ss6(5) ที่มีเปอร์เซ็นต์การตาย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังได้รับเชื้อ 7 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved