บทที่ 2

บทสอบสวนเอกสาร

หนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella* L.) และหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก (*Achroia grisella* F.) เป็นหนอนผีเสื้อที่สำคัญที่สุดในการเข้าทำลายผลิตภัณฑ์ของผึ้ง เช่น ไขผึ้ง แผ่นรวง รังของผึ้งทั้งในทีบเลี้ยงผึ้งและในโรงเก็บ ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากในแต่ละปี การควบคุมในอดีตนิยมใช้วิธีการรมควันหรือการควบคุมทางเคมี เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง (Morse,1978) และพบว่าหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ จะมีการเข้าทำลายที่รุนแรงหรือก่อให้เกิดความเสียหายมากกว่าหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก (Singh, 1962) แต่ในประเทศไทยพบว่ามีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งเท่ากันทั้งสองชนิด (สิริวัฒน์ วงษ์คิริ 2532)

การจัดเรียงลำดับชั้น(classification)ของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่และหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้

อาณาจักร (Kingdom)	Animalia
ไฟลัม (Phylum)	Arthropoda
ชั้น (Class)	Insecta
อันดับ (Order)	Lepidoptera
วงศ์ (Family)	Pyralidae
สกุล (Genus)	*Galleria*
	Achroia
สปีชีส์ (Species)	*Galleria mellonella* Linn.
	Achroia grisella Fabr.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

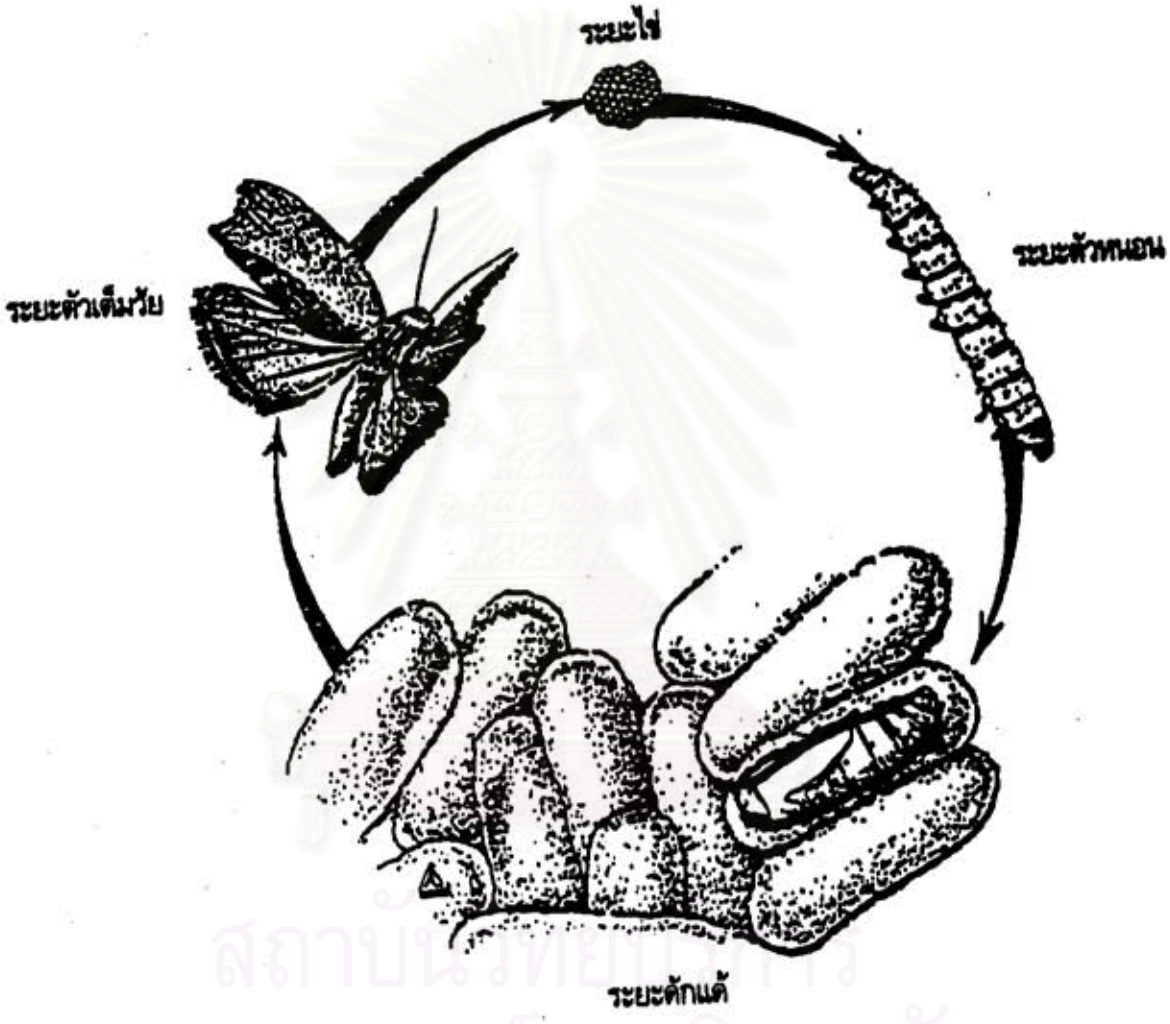
การแพร่กระจาย

ผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งทั้งสองชนิดมีการแพร่กระจายไปทั่วโลก พบการเข้าทำลายในทีบเลี้ยงผึ้งครั้งแรกในเมืองบอสตัน(Boston) รัฐแมสซาชูเซทส์ (Messachusetts) (Mangum, 1989) และสามารถพบได้ทั่วไปในเขตที่มีการเลี้ยงผึ้ง เช่น ในสหรัฐอเมริกา โดยเฉพาะในเขตอบอุ่นหรือเขตร้อนจะพบว่ามีการเข้าทำลายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งในปริมาณที่สูง

ลักษณะทั่วไป

ผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่และผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดเล็ก จัดเป็นผีเสื้อกลางคืน (moth) ที่มีการเจริญเติบโตและมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่สมบูรณ์ (complete metamorphosis) ซึ่งแบ่งการเจริญเติบโตออกเป็น 4 ระยะ ด้วยกันคือ ระยะไข่ (egg) ระยะตัวหนอน (larva) ระยะดักแด้ (pupa) และระยะตัวเต็มวัย (adult) ซึ่งในระยะของตัวหนอนเป็นระยะที่สำคัญ เพราะเป็นระยะที่มีการเข้าทำลายแผ่นรวงรัง และผลิตภัณฑ์ผึ้งที่ผลิตจากไขผึ้งมากที่สุด เนื่องจากเป็นระยะที่มีการกินอาหารมากที่สุดและนานที่สุดด้วย (Brewer and Winter, 1986)

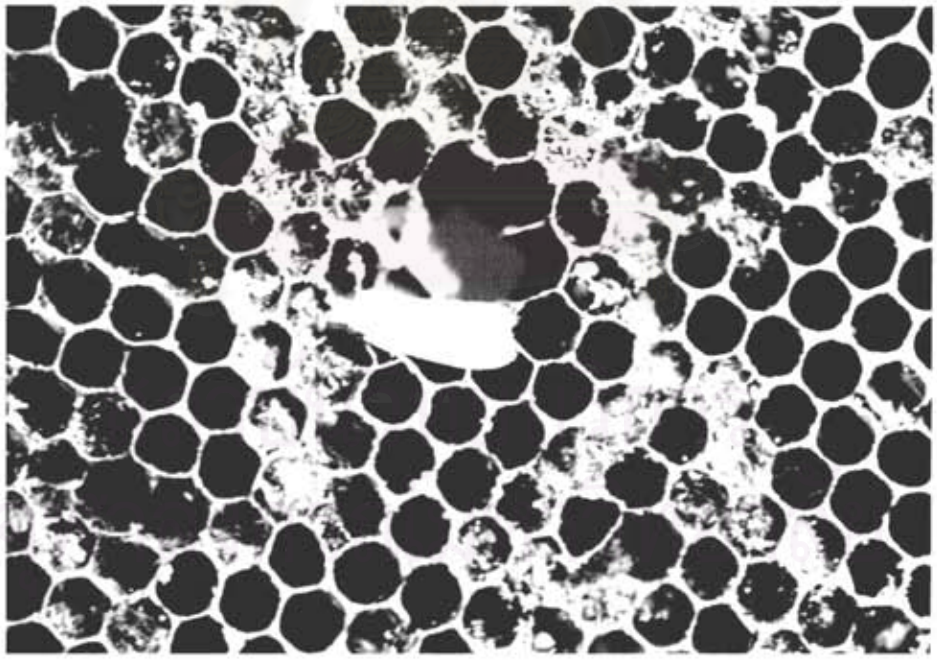
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



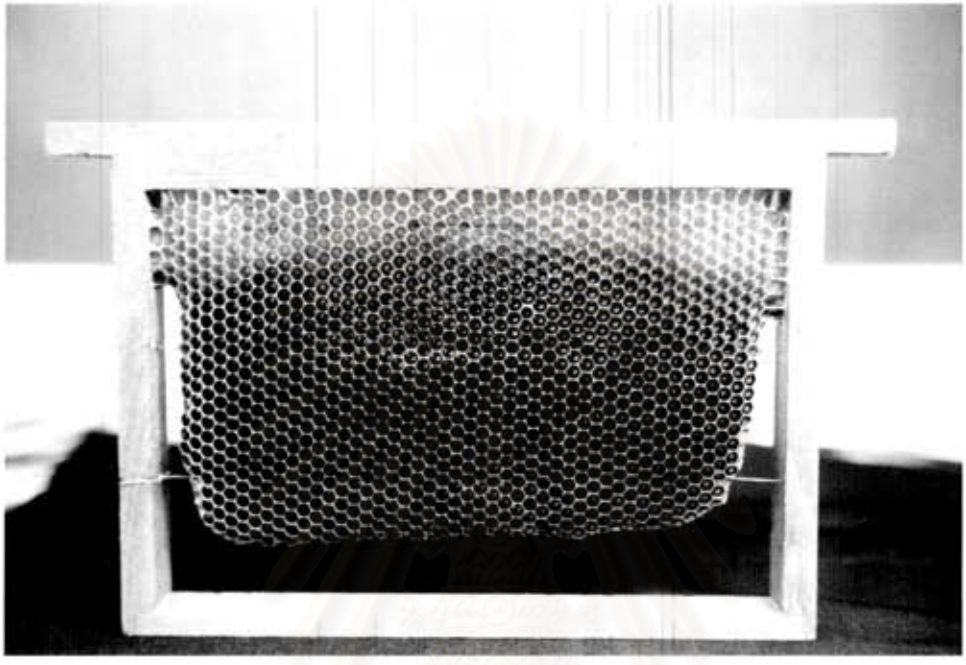
ภาพที่ 2.1 แสดงวงจรชีวิตของผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (USDA, 1970)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

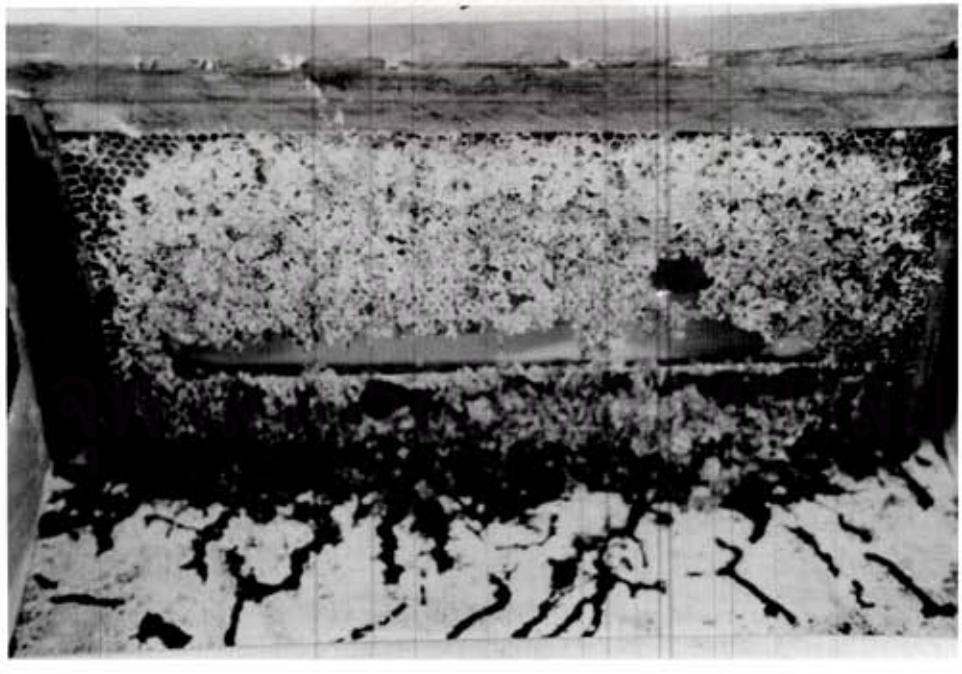
ภาพที่ 2.2 ตัวเต็มวัยของผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* F.



ภาพที่ 2.2 ตัวเต็มวัยของผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* L.



ภาพที่ 2.4 รวงรังผึ้งที่ยังไม่ถูกหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งเข้าทำลาย



ภาพที่ 2.4 รวงรังผึ้งที่ถูกหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งเข้าทำลาย

1. ผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่ แบ่งการเจริญออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้

1.1 ไข่ ไข่ของผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่ จะมีรูปร่างกลมสีขาวครีมขนาดประมาณ 0.4-0.5 มิลลิเมตร ไข่จะฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัยภายใน 6-10 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C (จักรา ภูอาษา, 2538) และที่อุณหภูมิ 10 °C ต้องใช้เวลานานถึง 5 สัปดาห์ ไข่จึงจะฟักออกมาเป็นตัวหนอน (Morse, 1978)

1.2 ตัวหนอน เมื่อไข่ฟักออกมาเป็นตัวหนอนจะกินน้ำผึ้ง น้ำตาลหรือเกสรเป็นอาหาร ซึ่งจะมีการเคลื่อนไหวอย่างรวดเร็ว ถ้ามีอาหารสมบูรณ์และอุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้น้ำหนักของตัวหนอนเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าในแต่ละวันภายใน 10 วันหลังจากฟักออกจากไข่ ตัวหนอนจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และสร้างใยทำเป็นช่องทางเดินภายในแหล่งอาหาร เพื่อป้องกันศัตรูเข้าทำลาย ลักษณะของตัวหนอนจะเป็นสีขาวครีมจนถึงสีเทาหรือสีเทาเข้ม ขึ้นอยู่กับแหล่งอาหาร โดยทั่วไปการเจริญในระยะตัวหนอนจะใช้เวลาประมาณ 28-35 วัน ที่อุณหภูมิ 30-35 °C จากการศึกษาของ Beck (1960) สามารถแบ่งตัวหนอนออกเป็น 7 ระยะด้วยกัน โดยแบ่งตามขนาดความกว้างของศีรษะ (head capsule) ของตัวหนอน

1.3 ดักแด้ ก่อนตัวหนอนจะเข้าดักแด้จะสร้างใยสีขาวปกคลุมลำตัว (cocoons) ขนาดดักแด้ที่สมบูรณ์จะต้องมีขนาดประมาณ 1.3-2.0 เซนติเมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-0.7 เซนติเมตร ดักแด้จะมีสีตั้งแต่สีขาวจนถึงสีเทา ดักแด้จะใช้เวลานาน 7-8 วัน แต่ในสภาพที่เย็นมากๆ จะอยู่ได้นานถึง 4 เดือนหรือมากกว่านั้น

1.4 ตัวเต็มวัย ลักษณะของตัวเต็มวัยจะประกอบด้วยปีก 2 คู่ เวลาเกาะจะพับเป็นรูปหลังคามีจุดสีดำหรือสีเทาบนปีก ขนาดลำตัวยาว 1/2 ถึง 3/4 นิ้ว หรือ 1.3-1.9 เซนติเมตร เมื่อกางปีกความยาวจากปลายปีกทั้งสองด้านของปีกคู่หน้าเท่ากับ 3.5-7.5 เซนติเมตร ตัวเต็มวัยจะผสมพันธุ์กันหลังจากออกจากดักแด้แล้ว 24 ชั่วโมง สามารถวางไข่ได้อย่างน้อย 300 ฟองในระหว่าง 3-30 วัน ซึ่งบางครั้งอาจวางไข่ได้ถึง 2,000 ฟอง ตัวเมียหลังจากผสมแล้วจะวางไข่ในตอนกลางคืน โดยการบินเข้าไปวางไข่ในหีบเลี้ยงผึ้งหรือในโรงเก็บคอนผึ้ง ซึ่งจะวางไข่เป็นกลุ่มๆตามช่องหรือซอกเล็กๆ ความแตกต่างระหว่างตัวเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้ที่สังเกตได้อย่างชัดเจนคือ ขนาดและสีบริเวณลำตัว ซึ่งพบว่าเพศเมียจะมีขนาดใหญ่และสีเข้มกว่าเพศผู้ การผสมพันธุ์ของตัวเต็มวัยเกิดจากตัวเต็มวัยเพศผู้ปล่อยสารเฟอโรโมน(pheromone) แล้วกระพือปีกเพื่อให้ตัวเมียเข้ามาผสมพันธุ์ (Shimanuki and Knox, 1988)

2. ผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดเล็ก (*Achroia grisella* F.)

2.1 ไข่ ไข่ของผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดเล็กมีลักษณะกลมรี สีขาวครีม ขนาดความยาวประมาณ 0.03-0.04 เซนติเมตร ไข่จะฟักออกเป็นตัวภายใน 3-4 วัน ที่อุณหภูมิ 30-35 °C

2.2 ตัวหนอน ตัวหนอนที่ฟักตัวออกจากไข่มีขนาดประมาณ 1.0 เซนติเมตร เคลื่อนที่ได้รวดเร็วมีสีขาวครีม เมื่อโตเต็มที่มีขนาดความยาวของลำตัวประมาณ 1.5-1.6 เซนติเมตร มีขนาดเล็กกว่าหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ การเจริญของหนอนขึ้นกับความสมบูรณ์ของอาหาร และอุณหภูมิ โดยทั่วไปการเจริญในระยะตัวหนอนจะใช้เวลาประมาณ 30-48 วัน ที่อุณหภูมิ 30-35 °C

2.3 ดักแด้ ดักแด้ของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก มีลักษณะแตกต่างจากดักแด้ของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ คือ ลักษณะการสร้างดักแด้ของตัวหนอน ในหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กจะไม่สร้างดักแด้เรียงกันชิดเป็นกลุ่ม แต่จะสร้างดักแด้อยู่เดี่ยวๆ พบตามบริเวณฐานรังหรือหีบเลี้ยงขนาดความยาวของดักแด้เรียงชิดกันเป็นกลุ่ม 1.0-1.1 เซนติเมตร การเจริญในระยะดักแด้จะใช้เวลาเฉลี่ยประมาณ 6-7 วัน

2.4 ตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัย ประกอบด้วยปีกปกคลุมลำตัว 2 คู่ มีสีเทาเงินถึงสีเหลืองอ่อนเมื่อหุบปีกจะแบนราบ ส่วนหัวมีสีเหลืองส้มมีขนาดเล็กกว่าหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ปกติขนาดความยาวของตัวเต็มวัยมีขนาดประมาณ 1.3-1.6 เซนติเมตร ตัวเต็มวัยของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ (Morse,1970) ตัวเต็มวัยสามารถวางไข่ได้ครั้งละประมาณ 250-300 ฟอง

การป้องกันกำจัดผีเสื้อหนอนกินไขผึ้ง

หนอนผีเสื้อกินไขผึ้งทั้งสองชนิดมีวิธีการป้องกันกำจัดเหมือนกัน การป้องกันเบื้องต้นคือการลดขนาดทางเข้าออกที่ฐานรังให้เล็กลงเพื่อป้องกันผีเสื้อลอบเข้าไปวางไข่ในเวลากลางคืนมีการตรวจรังผึ้งให้แข็งแรงอยู่เสมอ เพราะผึ้งงานจะคอยช่วยทำความสะอาด และกำจัดหนอนผีเสื้อได้ ถ้ารังผึ้งที่อ่อนแอควรเก็บคอนเก่าออกเพื่อไม่ให้ถูกทำลายโดยหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง และทำความสะอาดฐานรังผึ้งไม่ให้เป็นแหล่งอาหารของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง (สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, 2532) นอกจากนั้นแล้วยังมีวิธีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งในโรงเก็บ เนื่องจากรวงผึ้งที่สลัดน้ำผึ้งออกแล้วหลังฤดูเก็บเกี่ยวน้ำผึ้ง จะเก็บไว้ใน

โรงเก็บมีการถูกทำลายเนื่องจากมีการระบายอากาศไม่ดี, อุณหภูมิสูง เหมาะแก่การเจริญเติบโตของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง การควบคุมจึงแบ่งออกเป็นดังนี้

1. การควบคุมทางกายภาพ (Physical control)

อุณหภูมิสามารถใช้ในการควบคุมผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งได้ทุกระยะ โดยไม่เป็นอันตรายต่อคนและผึ้ง เนื่องจากไม่มีพิษตกค้างในรวงผึ้ง และน้ำผึ้ง

การใช้ความร้อน (heat) ทุกระยะของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งสามารถฆ่าได้โดยการอบรวงผึ้งในห้องอบความร้อน ซึ่งมีเครื่องควบคุมอุณหภูมิและพัดลมเพื่อช่วยให้อากาศหมุนเวียนได้ดีที่อุณหภูมิ 46 °C และ 48 °C เป็นเวลา 80 และ 40 นาที ตามลำดับ ถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้จะทำให้ไขผึ้งละลายได้

การใช้ความเย็น (cooling) การใช้ความเย็นในการควบคุม หนอนผีเสื้อกินไขผึ้งเป็นวิธีที่ง่ายและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายมีความปลอดภัยสูง ไม่ทำให้แผ่นรวงรังเกิดความเสียหาย ได้มีการทดลองใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกันในการควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งที่อุณหภูมิต่ำในระยะเวลาต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา
-17	1-5 ชม.
-18 ถึง -15	2 ชม.
-12	3 ชม.
-7	4-5 ชม.
0	มากกว่า 4 ชม.
2	มากกว่า 6 วัน
5	มากกว่า 10 วัน
10	มากกว่า 15 วัน

และที่อุณหภูมิ 15 °C ตัวหนอนทุกระยะสามารถมีชีวิตอยู่ได้ถึง 8 สัปดาห์ โดยไม่มีการเพิ่มขนาดลำตัว (Burges, 1978)

2. การควบคุมโดยใช้สารเคมี (Chemical control) มีสารเคมีหลายชนิดสามารถใช้ควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งได้ทั้งในทีบเลี้ยงผึ้งและในโรงเก็บ ซึ่งสารเคมีที่นำมาใช้จะอยู่ในรูปของสารรมควัน (fumigants) ประเภทต่างๆได้แก่ para-dichlorobenzene (PDB), carbon disulphide, hydrogen cynanide, methyl bromide, phosphine, ethylene dibromide (EDB), ethylene oxide ผสมกับ inert gas และ carbon dioxide เป็นต้น สารรมควันเหล่านี้สามารถทำลายตัวหนอนระยะแรกที่ฟักออกจากไข่ แต่ไม่สามารถทำลายไข่ของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งได้ ยกเว้นการใช้ methyl bromide ซึ่งประสบความสำเร็จมาก โดยเฉพาะการควบคุมแผ่นรวงรังผึ้งในโรงเก็บ (Cantwell, 1980)

Trembley และ Burgett (1979) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ EDB และ PDB กับหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่โดยใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 เปอร์เซนต์การตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่จากการใช้สาร EDB และ PDB ที่อุณหภูมิต่างๆ

	อุณหภูมิ (°C)	% การตายของหนอนหลังจากการทดลอง	
		กลุ่มทดลอง	กลุ่มควบคุม
EDB(6mil)			
(48 ชั่วโมง)	10.0	18.3	7.2
	15.5	57.8	5.6
	21.1	77.8	2.8
	26.6	100.0	1.1
	32.2	100.0	2.2
PDB (4mil)			
(96 ชั่วโมง)	10.0	1.7	1.7
	15.5	3.9	3.3
	21.1	2.8	1.1
	26.6	13.3	1.7
	32.2	17.2	2.2

ประนอม ปัญจพัฒนศิริ (2538) ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทย *Azadirachta indica* var. *siamensis* Voleton ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งทั้งสองชนิด พบว่าความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทยและสะเดาอินเดียขึ้นอยู่กับวิธีการได้รับสารพิษและระยะของตัวหนอน โดยระยะที่ 3 และ 4 จะมีระดับความไวสูงกว่าหนอนระยะที่ 5 และได้มีการใช้สาร p-dichlorobenzene (1,4-dichlorobenzene หรือ PDCB) ซึ่งมีชื่อการค้าว่า Imker-Globol หรือ Styx ซึ่งเป็นสารที่ใช้ทำความสะอาดในห้องน้ำมาใช้ในการควบคุมผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งในโรงเก็บคอนผึ้งที่ใช้แล้ว ซึ่งในปี 1991 ได้ลงข่าวเกี่ยวกับพิษตกค้างของสาร PDCB ในน้ำผึ้ง จากการเก็บตัวอย่างน้ำผึ้งมาตรวจสอบของสถาบันการเลี้ยงผึ้งของมหาวิทยาลัย Landersanstalt ใน Hohenheim ประเทศเยอรมนี จากการทดลองใช้แผ่นรังเทียม (foundation) จำนวน 1 กิโลกรัมใส่ในภาชนะหรือกล่องที่มิดชิด นำสาร PDCB จำนวน 50 กรัมใส่เข้าไป พบว่าในระยะเวลา 1 เดือนแผ่นรังเทียมสามารถดูดซับสาร PDCB ได้ถึง 37.6 กรัม โดยในช่วงแรกจะมีการดูดซับอย่างรวดเร็ว จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนในน้ำผึ้ง ซึ่งในทางปฏิบัติแล้วการใช้สาร PDCB ในการควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งไม่สามารถที่จะทำให้ไขผึ้งปราศจากสารตกค้างของ PDCB ได้ จึงไม่ควรจะนำสารนี้มาใช้ในการควบคุมผีเสื้อหนอนกินไขผึ้ง (Wallner, 1992)

ไขผึ้ง (bee wax)

ไขผึ้งเกิดจากต่อมผลิตไขผึ้ง (wax gland) ของผึ้งงาน ซึ่งต่อมนี้เกิดมาจากการขยายตัวเป็นพิเศษของผนังลำตัวประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ต่อม (gland cells) ต่อมผลิตไขผึ้งนี้มีอยู่ที่ผิวด้านล่างของท้องปล้องที่ 4-5 เมื่อถึงระยะเวลาที่ผึ้งงานผลิตไขผึ้งในระหว่างที่ผึ้งงานมีอายุได้ 12-18 วัน ปัจจุบันไขผึ้งส่วนใหญ่ได้ถูกนำไปใช้ในส่วนผสมของเครื่องสำอาง ครีมล้างหน้า น้ำมันทาผิว ลิปสติก ที่ทาแก้ม และยังใช้ไขผึ้งในการทำเทียน กาว หมากฝรั่ง ตลอดจนดินสอสี และหมึก เนื่องจากคุณประโยชน์ที่ไม่ทำให้มีควันและมีกลิ่นหอม นอกจากนั้นคุณสมบัติทางกายภาพของไขผึ้งคือมีจุดหลอมเหลวอยู่ระหว่าง 60° - 69°C (142°-150°F) ความหนาแน่น 0.96 ที่อุณหภูมิ 20°C (68 °F) ดัชนีความหักเห 1.44 ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายใน alcohol ที่เย็น เบนซีน คลอโรฟอร์ม อีเธอร์ คาร์บอนไดซัลไฟด์ ไขผึ้งมีกลิ่นเฉพาะตัวเมื่อเกิดการเผาไหม้จะให้ควันน้อยปราศจากมลพิษและให้กลิ่นหอม (สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, 2532)

การใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีเพียงเซลล์เดียว จัดเป็นพวก prokaryotes คือ พวกเซลล์ชั้นต่ำที่ไม่มีนิวเคลียสที่แท้จริง โครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ โครงสร้างภายนอกได้แก่ แคปซูล (capsule) ผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) แฟลกเจลลา (flagella) และ พิไล (pili) หรือฟริมบรี่ (frimbriae) ส่วนโครงสร้างภายในได้แก่ ซัยโตพลาสสม (cytoplasm) ไรโบโซม (ribosome) โครมาตินิกบอดีส์ (chromatinic bodies) สปอร์ (spores) เม็ดสี (pigments) และสารสังเคราะห์แสง (photosynthetic apparatus) การเคลื่อนที่ของแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับรูปร่างและลักษณะโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย แบคทีเรียรูปร่างกลมจะไม่เคลื่อนที่ แบคทีเรียรูปร่างยาวเป็นท่อนจะเคลื่อนที่บ้าง และแบคทีเรียรูปร่างขดไปมาจะเคลื่อนที่ไปมาอยู่เสมอ การสืบพันธุ์ของแบคทีเรียส่วนมากไม่อาศัยเพศ แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตโดยการเพิ่มขนาดมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ในสภาวะที่ขาดอาหารหรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม แบคทีเรียจะมีการสร้างสปอร์เช่น แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Clostridium* จะสร้างสปอร์ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้ดี (สุวณี สุภเวชย์ และ มาลัย วรจิตร, 2536)

แบคทีเรียที่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Bacillus* สปีชีส์ที่สำคัญ คือ *thuringiensis* และมีสปีชีส์อื่นๆ แบคทีเรียบางชนิดทำให้แมลงเกิดโรคได้เช่น *Bacillus popilliae* เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ ทำให้เกิดโรคกับหนอนด้วงปีกแข็งจำพวก Japanese beetle (*Popillia japonica*) ซึ่งเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของต้นหญ้าในสหรัฐอเมริกา *Bacillus popilliae* พบโดย Dr. Dutky ในปี ค.ศ. 1940 เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จะเจริญเติบโตได้เฉพาะ ในแมลงพวกด้วง scarabaeids สำหรับการใช้อาหารเทียมเลี้ยงเชื้อนี้ยังไม่ประสบความสำเร็จ

Bacillus sphaericus ใช้ในการควบคุมแมลงพวกลูกน้ำยุง (*Culex quinquefasciatus*) พบว่า แบคทีเรียชนิดนี้จะสร้างสารพิษที่ผนังเซลล์

Bacillus moritai ทำให้เกิดโรคกับแมลงวัน (*Musca domestica*)

Bacillus larvae ทำให้เกิดโรค American foulbrood ในผึ้ง

สำหรับแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมแกรมติดสีน้ำเงิน (gram positive) และสร้างสปอร์ได้ภายในเซลล์ (endospore-forming bacteria)

Bacillus thuringiensis เป็นแบคทีเรียแกรมบวกเป็น facultative anaerobic bacteria เจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย แต่ขณะสร้างสปอร์ต้องการสภาพที่มีอากาศเต็มที่ รูปร่างของเซลล์เป็นท่อนตรง (rod-shaped) ขนาด 0.7 x 3.5 ไมโครมิเตอร์ เคลื่อนที่ได้ด้วย flagella สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ซึ่งจะอยู่ที่ปลายข้างหนึ่งของเซลล์ และในขณะที่แบคทีเรียชนิดนี้สร้างสปอร์ก็จะสร้างผลึกโปรตีนที่เรียกว่า Parasporal body หรือ crystal protein อยู่อีกข้างหนึ่งของเซลล์ ส่วนใหญ่มี 1 อัน และพบว่า crystal protein ใน *Bacillus thuringiensis* ส่วนใหญ่จะมีรูปเหมือนปิรามิด 2 อันด้านฐานชนกัน (bipiramidal shape) แต่ในบางสายพันธุ์จะสร้าง crystal protein รูปกลมหรือเหลี่ยมขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์

การสร้างผลึกโปรตีนนี้เป็นลักษณะประจำของ *Bacillus thuringiensis* ทุกสายพันธุ์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* ในอาหารเทียม แบคทีเรียจะเจริญเติบโตในระยะ vegetative growth อย่างรวดเร็ว เมื่อสิ้นสุดการเจริญเติบโตแบคทีเรียจะเริ่มสร้างสปอร์ภายในเซลล์ ซึ่งในระยะเดียวกันนี้ที่ปลายอีกข้างหนึ่งของแบคทีเรียก็จะมีการสร้างผลึกโปรตีน และจะสร้างเสร็จสมบูรณ์พร้อม ๆ กับการสร้างสปอร์ การสร้าง crystal protein นี้ไม่ใช่การตกผลึกของโปรตีนธรรมดาที่มีอยู่ในเซลล์แบคทีเรียในระยะ vegetative growth แต่เป็นโปรตีนที่หน่วยย่อยที่แบคทีเรียสร้างขึ้นโดยเฉพาะเพื่อรวมกันเป็นผลึกโปรตีน และสร้างขึ้นเฉพาะตอนที่มีการสร้างสปอร์

ผลึกโปรตีนหรือ crystal protein นี้ประกอบด้วยโมเลกุลที่มีรูปร่างเป็นแบบ dumb-bell shape ขนาดยาวประมาณ 15 นาโนมิเตอร์ และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 นาโนมิเตอร์ มีน้ำหนักโมเลกุล 230,000 daltons ประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด ไม่ทนต่อความร้อน และไม่ละลายในน้ำและ organic solvent อื่น ๆ แต่ จะละลายในด่าง ทนอยู่ในน้ำหรือในสภาพแห้งแล้งได้นาน เช่นในที่มืดและ ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียสได้นานถึง 10 ปี ผลึกโปรตีนนี้จะเป็น protoxin ที่เรียกว่า heat-labile protoxin เมื่อเข้าไปในตัวแมลงจะถูกน้ำย่อย proteolytic enzyme ในกระเพาะอาหารของแมลงย่อยสลายเป็นโปรตีนโมเลกุลย่อย ๆ ซึ่งเป็นพิษต่อแมลง

รายงานชิ้นแรกเกี่ยวกับการค้นพบเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เมื่อศตวรรษที่ 20 พบโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น ชื่อ Dr. Ishiwata ได้แยกเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จากตัวหนอนไหมที่เป็นโรค แล้วตั้งชื่อว่า *Bacillus sotto* ซึ่งในปัจจุบัน sotto เป็นสายพันธุ์หนึ่งของ *Bacillus thuringiensis* ในปี ค.ศ.1909-1912 Dr. Berliner พบเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์จากหนอนผีเสื้อกินแป้ง (*Anagasta kuehniella*) ซึ่งได้มาจากเมือง Thueringen และได้ตั้งชื่อว่า *Bacillus thuringiensis* ตามชื่อเมืองในประเทศเยอรมัน

สารพิษที่สร้างโดยเชื้อ *Bacillus thuringiensis*

แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สามารถที่จะผลิตสารพิษ (toxin) ได้หลายชนิด *Bacillus thuringiensis* ต่างสายพันธุ์กันก็จะสร้างสารพิษที่มีคุณสมบัติเฉพาะเจาะจงกับแมลงต่างชนิดกัน และมีความเป็นพิษมากน้อยแตกต่างกัน ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 5 ชนิด คือ

1. Delta (δ) endotoxin มีด้วยกันหลายชื่อ เช่น crystal toxin, parasporal inclusion เป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อน (heat-labile) ขณะที่เซลล์มีการสร้างสปอร์ก็จะมีการสร้างคริสตัลในเวลาเดียวกัน พบครั้งแรกโดย Hannay เมื่อปี ค.ศ. 1953 ในหนอนไหม (*Bombyx mori*) คริสตัลประกอบด้วยกลุ่มโมเลกุลของโปรตีนเกาะกันเป็นรูปไข่ หรือรูป dumb-bell มีความยาวประมาณ 15 nm. เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 nm. มีน้ำหนักโมเลกุล 230,000 dalton การสร้างคริสตัล ของ *Bacillus thuringiensis* ถูกกำกับโดย plasmid DNA โดยที่ *Bacillus thuringiensis* แต่ละสายพันธุ์สามารถสร้าง δ-endotoxin ได้ไม่เหมือนกัน (Chestukhina et al., 1988) การที่มี endotoxin สูงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการทำลายแมลงได้สูงขึ้น (Somerville, Tanada and Esther, 1970)

2. Bata (β) exotoxin หรือ thuringiensin หรือ thermostable exotoxin คือสารพิษที่ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ขณะที่เซลล์กำลังเจริญเติบโต β-exotoxin นี้บางที่เรียกว่า fly-factor, fly-toxin, hemt-stable exotoxin, เป็นสารประกอบพวก nucleotide ประกอบด้วย adenine, ribose, glucose และ phosphorylated allomucic acid ทนต่อความร้อนที่ 120°C ได้นานถึง 15 นาที เป็นสารที่ละลายน้ำได้เป็นอันตรายต่อแมลงโดยไปมีผลต่อระบบฮอร์โมนกระบวนการเมตาโบลิซึม และการสร้างเอนไซม์ต่างๆ

การใช้ β - exotoxin ต่อผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่พบว่าสามารถทำให้เกิดความผิดปกติกับผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่ได้ทุกระยะตั้งแต่ระยะหนอน ดักแด้ และเมื่อหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัยจะมีรูปร่างผิดปกติ เช่น ปีกยับไม่สามารถบินได้ ปากมีลักษณะผิดปกติรวมถึงขนาดของลำตัวสั้นลง ส่วนต่างๆของลำตัวบวมขึ้น จากการรวบรวมข้อมูลพบว่า exotoxin จะทำให้ส่วนของปากและปีกของแมลงผิดปกติด้วย (Burges, 1975)

3. Alpha (∝) exotoxin หรือ lecithinase หรือ phospholipase เป็นสารซึ่งสร้างขึ้นในเซลล์ และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1953 โดย Toumanoff นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกอื่นๆ อีกเช่น mouse factor, thermosensitive exotoxin เป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อน ละลายในน้ำได้ มีคุณสมบัติพิเศษ คือ เป็น hemolysin คือทำลายเซลล์เม็ดเลือด และมีผลในการขัดขวางการทำงานในของระบบสรีระวิทยาหลายอย่างในตัวแมลง

4. Gamma (Υ) exotoxin เป็นสารพิษที่ไม่ทนต่อความร้อนอ่อนแอต่ออากาศ ก๊าซออกซิเจน และแสงอาทิตย์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60°C จะถูกทำลายภายใน 10-15 นาที

5. Louse factor พบโดย Gingrich ในปี 1974 ซึ่งพบว่ามีเหาถึง 4 ชนิด ด้วยกันที่แสดงอาการผิดปกติเมื่อได้รับเชื้อ *Bacillus thuringiensis kurstaki* (HD-1) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้าง exotoxin และพบว่าอาการผิดปกติไม่ได้เกิดจาก endotoxin จึงรายงานว่าคงเป็นสารพิษอีกชนิดหนึ่งที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและให้ชื่อสารนี้ว่า Louse factor

ข้อแตกต่างระหว่าง exotoxin และ endotoxin

Exotoxin คือ สารที่ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ขณะที่แบคทีเรียยังมีชีวิตอยู่ อาจถูกปล่อยลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อหรือในแมลงที่ถูกแบคทีเรียเข้าทำลาย exotoxin ละลายในน้ำได้และสามารถแยกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อได้ง่าย จะมีผลต่อแมลงที่ผ่านระยะฟักตัวแล้ว กระตุ้นให้มีการสร้าง antitoxin และเสื่อมสลายได้เร็วในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม

Endotoxin คือสารที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรีย และคงอยู่ภายในเซลล์ไม่ปล่อยออกมาภายนอก จะปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ก็ต่อเมื่อเซลล์แตกหรือแบคทีเรียตาย มีผลต่อแมลงเมื่อเมื่อเซลล์แบคทีเรียแตกสลาย ไม่กระตุ้นให้มีการสร้าง antitoxin มีความคงทนเป็นพิเศษต่อความร้อนและสารเคมีละลายในสารละลายที่เป็นด่าง

การจัดจำแนกยีนที่สร้างคริสตัลโปรตีน (Cry genes)

ในปี 1989 Hofte และ Whiteley ได้วิจัยพบแบบแผนสำหรับ Cry genes ซึ่งในขณะนั้นมี 40 genes ที่ถูก cloned และศึกษาลักษณะของ genes โดย genes จะถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม การจัดกลุ่มยึดความจำเพาะต่อแมลง และดูความคล้ายกันของลำดับเบสของ nucleotide genes แบบที่1 สามารถถอดระหัสแล้วได้โปรตีนขนาด 130 kDa. ซึ่งโดยปกติจะมีผลเฉพาะกับแมลงในอันดับ Lepidoptera เท่านั้น genes แบบที่2 สามารถทอดรหัสแล้วได้โปรตีนที่มีขนาด 70 kDa. ซึ่งเป็นโปรตีนที่จะมีผลต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera เป็นหลักแล้วยังมีผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก gene คือ Cry IIA ซึ่งมีผลต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera และ Diptera genes แบบที่ 3 สามารถทอดรหัสให้โปรตีนที่มีขนาด 70 kDa. และโปรตีนนี้จะมีผลต่อแมลงในอันดับ Coleoptera genes แบบที่ 4 จะให้โปรตีนที่มีขนาด 130 kDa. และ 70 kDa. ซึ่งโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ถูกแยกได้จาก *Bacillus thuringiensis israelensis* ซึ่งจะมีผลต่อตัวอ่อนของยุงและริ้นดำ (mosquitos and black fly) ในแมลงอันดับ Diptera สูง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 การจัดจำแนกของ *Bacillus thuringiensis* crystal Protein Genes

Gene	Crystal	size[a] (kDa)	Acces number[b]
Type I			
CryIA(a)	Bipyramid	113	M11250
CryIA(b)	Bipyramid	131	M13898
CryIA(c)	Bipyramid	133	M11068
CryIB	Bipyramid	138	X06711
CryIC	Bipyramid	135	X07518
CryID	Bipyramid	133	X54160
CryIE	Bipyramid	133	X53985
CryIF	Bipyramid	134	X63897
CryIG	Bipyramid	130	X58120
Type II			
CryIIA	Cuboid	71	M31738
CryIIB	?	71	M23723
CryIIC	Cuboid	69	X57252
Type III			
CryIIIA	Flatsquare	73	M22472
CryIIIB	Irregular	74	X17123
CryIIIB(b)[c]	Irregular	74	M89794
Type IV			
CryIVA	Bipyramid	134	Y00423
CryIVB	bipyramid	128	X07423
CryIVC	?	78	M12662
CryIVD	Round?	72	M31737
CrytA	Irregular	27	XX03182
Not classified			
CryX1(IIIC)	Bipyramid	129	M64478
CryX2(IIID)	Square	73	X59797
CryX3	Cuboid	35	-
CryX4	Cuboid	38	-

[a]Protein size deduced from the nucleotide sequence.

[b]GenBank (v.70)EMBL(v.29) accession number for the holotype sequence.

[c]May be designated cryIIIB2.

(Yamamoto and Powell, 1993)

ตารางที่ 2.4 แสดงลำดับของยีนที่สร้างผลึกของโปรตีน ในแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆ

Crystal protein gene	B. thuringiensis subsp. and/or strain	No.of amino acid differences from holotype sequence[a]		Reference
		Protoxin	Toxin	
CryIA(a)	kurstaki HS-1	H	H	79
	aizawai	3	2	85
	kurstaki HD-1	1	0	52
	sotto	24.3	83.84	
	entomocidus	1	0	64a
Cry IA(b)	berliner 1715	H	H	2, 92
	berliner1715	2	0	39
	kurstaki HD-1	2	2	52
	kurstaki HD-1	5	4	27,88
	aizawai IPL-7	4	2	73
	kurstaki HD-1	6	2	23
	kurstaki NRD-12	10	6	33
	aizawai IC-1	4	4	30
CryIA(c)	kurstaki HD-73	H	H	3
CryIB	thuringiensis HD-2	H	H	7
	entomocidus HD-110	1	1	Hofte,unpublished
CryIC	entomocidus 601	H	H	42
	aizawai HD-137	7[d]	7	77
	entomocidus Hd-110	2	2	Hofte, unpublished
CryID	aizawai HD-68	H	H	Hofte, unpublished
CryIIA	kurstaki HD-263	H	H	17
	kurstaki HD-1	0	0	98
CryIIB	kurstaki HD-1	H	H	98
CryIIIA	san diego	H	H	35
	tenebrionis	0	0	40,69,81
	EG2158	0	0	18
CryIVA	israelensis	H	H	96
	israelensis	4	1	82
CryIVB	israelensis	H	H	13
	israelensis	1	1	89
	israelensis	3	3	82
	israelensis	97	78	106
CryIVC	israelensis	H	H	88
CryIVD	israelensis	H	H	16
Cry	israelensis	H	H	91
	morrisoni PG-14	1	1	19
	israelensis	0	0	93
	morrisoni PG-14	1	1	24

(Hofte and Whiteley, 1989)

ภาพที่ 2.6 ภาพถ่ายอิเล็คตรอนแสดง sporangium ของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* และองค์ประกอบภายใน (S = spore, C = crystal protein, E = exosporium)

(จาก "Microbial Control of Insects and Mites by H. D. Burges and N. W. Hussey. 1971)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลไกการออกฤทธิ์ (Mode of Action)

เมื่อแมลงกินเชื้อ *Bacillus thuringiensis* เข้าไป เซลล์แบคทีเรียจะสลายตัวในกระเพาะอาหารของแมลงและปล่อยสปอร์ผลึกโปรตีนออกมาโดยเอนไซม์ protease ในกระเพาะอาหารของแมลงจะย่อยสลายผลึกโปรตีนให้เป็นหน่วยย่อยๆ จากผลึกโปรตีนที่ไม่มีพิษ (protoxin) ทำให้กลายเป็นสารพิษ (true toxin) (Chilcott et al., 1981) ซึ่งสารพิษนี้จะไปจับกับ receptors ที่เฉพาะบน brush border ใน epithelial cell ของกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลง (Knowles, 1994) โดยสารพิษนี้จะมีผลเริ่มแรกที่ผนังกระเพาะอาหาร ทำให้ epithelial cell ของกระเพาะอาหารเปลี่ยนแปลงไป คือจากที่เคยเรียงตัวกันอย่างหนาแน่น กลายเป็นลักษณะเหมือนฟองสบู่เรียกว่า soap-bubble เซลล์จะพองบวมแยกสลายจากกัน และหลุดออกจาก basement membrane ต่อมาเซลล์ก็จะแตกทำให้สารต่างๆ เกิดการผสมปนกันในกระเพาะอาหารและช่องว่างในตัวแมลง ซึ่งในบางกรณีสารพิษจะมีผลต่อความสามารถในการกันการซึมผ่านเข้าออกของสารต่างๆ คือทำให้โปแตสเซียมไอออน (K^+) ซึมผ่านจากผนังกระเพาะอาหารเข้าไปในเลือดหรือช่องว่างภายในตัวของแมลงทำให้ปริมาณ K^+ ในเลือดเพิ่มสูงมากขึ้นการเปลี่ยนแปลงไอออนในกระเพาะอาหาร และเลือดทำให้ pH ในตัวแมลงเปลี่ยนไป นอกจากนี้ยังมีผลต่อการส่งและรับความรู้สึกที่ถ่ายทอดผ่านรอยต่อเซลล์ประสาท (synapse) ของระบบประสาททั้งหมดนี้เป็นสาเหตุของการทำให้เกิดอัมพาต กรามเกร็งแข็ง อ้าปากไม่ได้และเคลื่อนไหวไม่ได้ทำให้แมลงตายในที่สุด (Federici 1982; Rishikesh)

ความจำเพาะของ δ- endotoxin ที่มีต่อแมลงขึ้นอยู่กับปัจจัยสามประการด้วยกันคือ สายพันธุ์ของแบคทีเรีย, น้ำย่อยในกระเพาะอาหารของแมลง ซึ่งมีความสำคัญต่อกลไกการเกิดพิษ และชนิดของแมลง จากการศึกษาความเป็นพิษของ δ - endotoxin โดยการแยกสารพิษออกจาก *Bacillus thuringiensis* 14 สายพันธุ์จาก 12 สปีชีส์ย่อย โดยการทดสอบความเป็นพิษกับหนอน 3 ชนิด พบว่า δ-endotoxin ที่ได้จากแต่ละสายพันธุ์มีความเป็นพิษต่อแมลงแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดย *Bacillus thuringiensis thuringiensis* และ *Bacillus thuringiensis morrisoni* มีความเป็นพิษต่อหนอน *Pieris brassicae* (Lepidoptera) แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis kenyae* และ *Bacillus thuringiensis kurstaki* มีความเป็นพิษสูงต่อหนอน *Heliothis virescens* (Lepidoptera) และ *Bacillus thuringiensis entomocidus* มีความเป็นพิษสูงต่อหนอน *Spodoptera littoralis* (Jaquet et al., 1987) นอกจาก δ-endotoxin จะขึ้นอยู่กับชนิดของ *Bacillus thuringiensis* แล้ว ยังขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ประสิทธิภาพของ δ-endotoxin จะต้องใช้การทดสอบทางด้าน bioassay เท่านั้นไม่สามารถทำนายจาก serotype และอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อหรือจำนวนของสปอร์ (Dulmage, 1970)

ลักษณะโดยทั่วไปของแมลงภายหลังที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย จะมีการเคลื่อนไหวเชื่องช้าลง หยุดเคลื่อนไหวไม่อยากกินอาหาร สำรอกอาหารออกมา และมีอาการเป็นพิษในทางเดินอาหาร โดยแบคทีเรียจะเข้าไปในช่องว่างในลำตัวแมลง ทั้งนี้อาจผ่านเข้าทางแผลที่ผนังลำตัว หรือแผลที่กระเพาะอาหาร ในระหว่างการลอกคราบ อาจผ่านจากเซลล์กระเพาะอาหารเข้าไปในเลือด เนื่องจากผนังรอบท่ออาหาร (peritrophic membrane) ซึ่งเป็นด่านกั้นอยู่หลุดไปพร้อมกับการลอกคราบ แบคทีเรียจะทวีเพิ่มจำนวนในช่องว่างภายในลำตัวของแมลง หรือในเลือดแมลง เกิดการทำลายอวัยวะต่างๆ แบคทีเรียบางชนิดจะสร้างสารพิษ (toxin) ซึ่งมีผลทางตรงหรือทางอ้อมต่อการย่อยอาหารในแมลง เมื่อแมลงตายแล้วจะมีสีเข้มขึ้นเป็นสีน้ำตาล และดำ ตัวอ่อนนุ่มรูปร่างไม่คงที่อวัยวะภายในเหลว และมีกลิ่นเหม็น

อาการของแมลงภายหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียมักทำให้การย่อยอาหาร การหายใจและการหมุนเวียนโลหิตของแมลงผิดไปจากปกติ การเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ เกือบทุกชนิดในแมลง เช่น แบคทีเรียที่เข้าทำลายชั้น epithelial cells ของท่ออาหารของแมลง จะทำให้เซลล์บวมโตและแตก เม้ว่าเซลล์ชั้นนี้จะลอกหลุดไปพร้อมกับการลอกคราบและแมลงสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาแทน แบคทีเรียที่ออกมาจากเซลล์เก่าที่แตกแล้ว จะเข้าทำลายเซลล์ใหม่ทันทีในเวลาอันรวดเร็ว

แบคทีเรียอาจมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของกระเพาะอาหารของแมลง ทำให้แมลงย่อยอาหารไม่ได้เต็มที่ แมลงอาจตายเพราะการขาดสารอาหารมิใช่จากสารพิษหรือการทวีจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ความผิดปกติอันเนื่องมาจากเอนไซม์ซึ่งแบคทีเรียสร้างขึ้นในระหว่างการเจิญเติบโต เช่น *Bacillus cereus* สร้างเอ็นไซม์ exoenzyme lecithinase ในระหว่างที่เซลล์แบคทีเรียทวีจำนวนมากขึ้น เอนไซม์นี้จะทำลายนิวเคลียสของ epithelial cells ทำให้เซลล์ชั้นนี้แตกสลาย เปิดโอกาสให้เชื้อแบคทีเรียเข้าไปในช่องว่างในตัวแมลงทวีจำนวนในเลือดและทำให้เกิดสภาวะเลือดเป็นกรด (septicemia) เมื่อเซลล์ผนังรอบท่ออาหารของแมลงถูกทำลาย ทำให้ pH ของสารในกระเพาะอาหารและ pH ของเลือดเสียสมดุลย์ เลือดของแมลงมีคุณสมบัติเป็น buffer ต่ำมาก ดังนั้น pH ในเลือดเพิ่มเพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้เกิดอาการอัมพาตได้ การสูญเสียน้ำในเลือดเป็นอีกลักษณะหนึ่งที่พบในแมลงที่เป็นโรคจากเชื้อแบคทีเรีย และเมื่อเป็นโรคมากๆ เนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ เกิดการแห้งไปด้วย การสูญเสียน้ำอย่างมากมายนี้เกิดจากความผิดปกติของระบบขับถ่ายของเสีย และอาจรุนแรงจนทำให้แมลงตายเพราะการขาดน้ำได้ จากการศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่พบว่า ผลึกคริสตัลโปรตีนจะให้ประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนได้น้อยกว่าสปอร์ ส่วนจำนวนของ endotoxin จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงโดยที่ปริมาณของ endotoxin มากขึ้นจะทำให้การฆ่าตัวหนอนสูงขึ้นด้วย (Burges, Hiller and Chanter, 1975) นอกจากการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* แล้วยังมีการใช้ *Bacillus thuringiensis* ผสมกับยาปฏิชีวนะ

พวก chlorotetracycline (cte) ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูให้สูงขึ้นอีกด้วย (Ignoff et al., 1977)

Canwell (1980) ได้ทำการทดลองใช้ Certan™ (*Bacillus thuringiensis kurstaki*) จากบริษัท Sandoz ในการควบคุมผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่ในโรงเก็บคอนผึ้งที่เมือง Beltsville ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อปี ค.ศ. 1979 ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 35-68 % พบว่าการใช้ Certan™ ที่ความเข้มข้น 0.05 % สามารถป้องกันการทำลายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งได้ 100 % ส่วนที่ความเข้มข้น 0.001 % พบว่าแผ่นรวงรังผึ้งมีการถูกทำลายเพียงเล็กน้อย และสามารถป้องกันได้นานถึง 12 เดือน และบริษัท Sandoz ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของยา SAN 401 ในการป้องกันกำจัดผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งที่เมือง Basel ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ พบว่าที่ความเข้มข้น 5 % หลังจากการทดลอง 1 เดือน สามารถป้องกันการเข้าทำลายได้ 100 % ในแผ่นรวงรังผึ้งที่ยังไม่มีตัวหนอนเข้าทำลาย ส่วนแผ่นรวงรังที่ถูกตัวหนอนเข้าทำลายบ้างจะหยุดการทำลายในที่สุด และสามารถป้องกันได้นานถึง 8 เดือน

Vandenberge และ Shimanuki (1990) ได้ทำการทดลองความคงทนและประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* ในการป้องกันกำจัดหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ โดยวิธีการฉีดพ่นลงในแผ่นรวงรังของผึ้ง พบว่า *Bacillus thuringiensis* ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีประสิทธิภาพลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ *Bacillus thuringiensis* ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และพบว่าสปอร์สามารถคงอยู่ได้ในทีบเลี้ยงผึ้งนานถึง 10-20 สัปดาห์ โดยที่สามารถป้องกันการเข้าทำลายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้นในประเทศไทยได้มีการแยกสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* เพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก และควบคุมปริมาณของลูกน้ำยุงต่าง ๆ ได้แก่ ลูกน้ำยุงก้นปล่อง และยุงลาย ซึ่งเป็นพาหะนำโรคมาลาเรีย และโรคไข้เลือดออก โดยการนำผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดหนอนแมลงที่มี *Bacillus thuringiensis* เป็นส่วนประกอบที่สำคัญมาใช้ในการควบคุมหนอนใยผัก สายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีประมาณ 5 สายพันธุ์ เช่น *aizawai, kurstake, israelensis, sandiego* และ *tenebrionis* บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษทำลายหนอนผีเสื้อในกลุ่ม Lepidoptera บางสายพันธุ์ใช้ควบคุมลูกน้ำยุง ในอันดับ Diptera ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีน (Cry gene) ซึ่งเหล่านี้ได้ถูกแยกขยายและตัดต่อโดยเทคนิคทางพันธุกรรม เพื่อนำไปสู่การปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่น การนำยีน CyrIA (a) เข้าสู่ *Bacillus thuringiensis* ทำให้จุลินทรีย์สร้างผลึกสารพิษที่ทำลายหนอนผีเสื้อ *Phertella xylostel* ในกลุ่ม Lepidoptera ได้ นอกจากการคัดเลือกสายพันธุ์และการปรับปรุงส่วนผสม (formulation) ให้เหมาะสมแล้วยังมีการใช้ chitinase เป็นส่วนผสมกับ *Bacillus thuringiensis* เพิ่มประสิทธิภาพการทำลายหนอนวัยต่าง ๆ ให้ได้ดียิ่งขึ้น

อัจฉรา ตันติโชดก (2535) ได้ทำการทดลองกับหนอนม้วนใบ (*Archips* sp.)โดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis kurstaki* ชนิดผง, Flobac ชนิดน้ำเข้มข้น และสายพันธุ์ TNR-2 ที่ผลิตขึ้นเอง ในห้องปฏิบัติการ พบว่าการใช้แบคทีเรียจะให้ประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดได้ดีกว่าการใช้สารเคมี

การใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ควบคุมแมลงต่างๆ การที่จะประสบความสำเร็จหรือมีประสิทธิภาพสูงยังขึ้นอยู่กับวิธีการใช้ การพ่นให้เป็นฝอยเล็กๆจะเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าแมลงได้สูงขึ้นและได้มีการนำเอา *Bacillus thuringiensis* ผสมกับยาฆ่าแมลง จากการทดลองในปี 1990-1992 กับหนอน *Ostrinia nubilalis* และ *Helicoverpa zea* ในข้าวโพดหวาน พบว่า *Bacillus thuringiensis kurstaki* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดได้มากขึ้น (Payne and Van, 1995)

ผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย

แบคทีเรีย *Bacillus* จัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogen) ต่อคนและสัตว์ ยกเว้นบางสายพันธุ์ เช่น *Bacillus anthrasis* ทำให้เกิดโรคแอนแทรกซ์ และ *Bacillus cereus* ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ การใช้ *Bacillus thuringiensis* ในการป้องกันกำจัดหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่จะไม่มีพิษต่อผึ้ง จากการทดลองของ Ali และคณะ (1973) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อผึ้งโดยการผสม *Bacillus thuringiensis* ลงในน้ำเชื่อมให้ตัวเต็มวัยของผึ้งกิน พบว่าไม่ทำให้ผึ้งตาย ขณะที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันนี้ทำให้หนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ตายมากกว่า 75 % ในสหรัฐอเมริกา แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคต่างๆในแมลง จะอนุญาตให้ใช้ได้เฉพาะทางการเกษตร ไม่อนุญาตให้ใช้ในอาหารมนุษย์ และ *Bacillus thuringiensis* จะมีความปลอดภัยต่อผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร แบคทีเรียที่ถูกพัฒนาขึ้นมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชจะต้องมีรายงานการทดลองมาก่อนแล้วว่ามีความปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์มีกระดูกสันหลังและพืช (Falcon, 1971) ระดับความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis kurstaki* (LD_{50}) เท่ากับ 5000 mg/kg โดยไม่มีความเป็นพิษต่อพืช (non-phytotoxic) สำหรับ *Bacillus thuringiensis aizawai* จะไม่มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลือดอุ่น (Thomson, 1994)

Johnson (1982) ได้ศึกษาความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis kurstaki* พบว่ามีผลกระทบต่อผีเสื้อนอกเป้าหมาย 3 ชนิด ในสภาพธรรมชาติ ซึ่ง *Bacillus thuringiensis kurstaki* ได้ถูกใช้ในการควบคุมผีเสื้อกินต้นสน (*Cymantria dispar*) และหนอนเจาะต้นสน (*Choristoneura occidentalis*) ในป่าสนโดยการฉีดพ่นทางอากาศซึ่งในธรรมชาติ *Bacillus thuringiensis* จะมีช่วงชีวิตสั้น (half-life) ซึ่งทำให้เชื่อว่า *Bacillus thuringiensis* จะมีผลต่อผีเสื้อที่นอกเป้าหมาย (non target sp.) ต่ำ จากความเชื่อนี้ทำให้เกิดผลกระทบอย่างฉับพลัน และผลกระทบในระยะยาวของการใช้จุลินทรีย์ควบคุมแมลง การทดลองได้ทำการทดสอบความเป็นพิษ และสารตกค้างของ *Bacillus thuringiensis* ต่อตัวอ่อนของ ผีเสื้อหางติ่ง (swallowtail butterflies) ที่เจาะกินต้นไม้ 2 ชนิดคือ *Papilio glaucus* และ *P. csnnadensis* และผีเสื้อโพรมีเธีย (*Callosamia promethea*) โดยการใช้อัตราส่วน 40 BIU/ha เป็นการใช้มือฉีด และเครื่องฉีด โดยการฉีดพ่นไปบนต้นไม้ที่มีหนอนในระยะที่ 1 และระยะที่ 4 ผลของการทดลองพบว่า *Bacillus thuringiensis* สามารถตกค้างบนต้นดอกทิวลิป (tulip) ได้นานถึงถึง 30 วัน ซึ่งมีผลต่อหนอน *P. giucucus* ระยะที่ 4 ทำให้เชื่อว่า *Bacillus thuringiensis* จะมีผลต่อแมลงกลุ่มนอกเป้าหมายบางชนิด ซึ่งจะมีผลอย่างน้อย 30 วัน หลังการฉีดพ่น

มีนา หวังสถิตสถาพร (2526) ได้ศึกษาผลกระทบของ *Bacillus thuringiensis israelensis* ต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมายโดยใช้สัตว์น้ำต่างๆ 4 ชนิด ได้แก่ ลูกกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man), แมลงดานาสวน (*Diplongchus rusticum* Fabr.), ลูกปลานิล (*Tilapia nilotica* Cinn.) และปลาหางนกยูง (*Poecillia reticulate* Peters) พบว่า *Bacillus thuringiensis israelensis* ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย ทั้ง 4 ชนิด โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 10 ppm. ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่จะแนะนำให้ใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย