หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

บทสอบสวนเอกสาร

1. Bacillus thuringiensis var. israelensis serotype H-14

Dr. Berliner พบ B. thuringiensis เป็นครั้งแรกในหนอนผีเสื้อแป้ง (Mediteranian flour moth) ที่เมืองทูรินเจีย (Thuringia) ประเทศเยอรมัน ในปี ค.ศ.1909 ต่อมาในปี ค.ศ.1915 ได้ตั้งชื่อว่า Bacillus thuringiensis Berliner ในปี 1953 Hannay ได้ศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมโดยเสนอว่าส่วนที่ทำให้แมลงเกิดโรคเป็นโปรทีนซึ่งเป็นผลึกอยู่ข้างสปอร์ (parasporal crystal) ในปี ค.ศ.1954 Angus ได้ศึกษาเพิ่มเติมและสนับสนุนข้อเสนอของ Hannay (Burges and Hussey 1971; Faust 1976.)

เมื่อ Dr. Steinhaus นำการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีมาใช้ ก็เริ่มใช้ B. thuringiensis ในการควบคุมหนอนผีเสื้อ ในพื้นที่การเกษตรและป่าไม้ ซึ่งได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ต่อมามีผู้พยายามนำ B. thuringiensis นี้มาใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุงซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุข แต่ไม่ได้ผลเท่าที่ควร เนื่องจากสายพันธุ์ดังกล่าวมีความเฉพาะเจาะจงกับพวกหนอนผีเสื้อมากกว่าลูกน้ำยุงและแมลงวัน (Burges and Hussey 1971.)

ในปี ค.ศ.1966 องค์การอนามัยโลกจึงเริ่มทำการสำรวจและแยกเชื้อจุลินทรีย์จากลูกน้ำยุงที่เป็นโรคตาย เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุงโดยชีววิธีต่อไป ในการสำรวจครั้งนี้ Dr. Singer ได้แยกแบคทีเรียจากลูกน้ำยุงที่ตาย และพบแบคทีเรียที่น่าสนใจซึ่งอาจนำมาใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุงได้ 2 ชนิดคือ B. thuringiensis var. thuringiensis ในกลุ่มที่ 1 และ B. sphaericus SSII-1 ในกลุ่มที่ 3 แล้วนำไปทดลองปรากฏว่าสามารถทำให้ลูกน้ำยุงลาย Aedes aegypti และลูกน้ำยุงบ้าน Culex quinquefasciatus ตายได้ดี (Singer 1973; 1974.)

Hall และคณะ (1977) ได้ทดลอง B. thuringiensis 127 สายพันธุ์กับลูกน้ำยุงพบว่าแบคทีเรียที่ใช้ควบคุมลูกน้ำยุงได้มีอยู่ 2 สายพันธุ์คือ HD-169/R - 567B (B. thuringiensis var. kurstaki) และ HD-96/R -574B (B. thuringiensis var. thuringiensis) ซึ่งต่อมา Panbangred และคณะ (1979) รายงานว่า สายพันธุ์ HD-1 (B. thuringiensis var. kurstaki) และ BA-068 (B. thuringiensis var. thuringiensis สามารถทำให้ลูกน้ำยุงลายและยุงบ้านตายได้ดีเช่นกัน โดยส่วนที่เป็นพิษของลูกน้ำยุงเป็นผลึกโปรทีนซึ่งสร้างขึ้นจากสายพันธุ์ที่มีการสร้างสปอร์

ต่อมา Goldberg และ Margalit (1977) ได้แยก B. thuringiensis สายพันธุ์ใหม่จากดินในแหล่งเพาะพันธุ์ยุง ประเทศอิสราเอล แล้วนำมาทดลองกับลูกน้ำยุง Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Cx. univittatus, Cx. pipiens และ Ae. aegypti ปรากฏว่ามีประสิทธิภาพในการทำให้ลูกน้ำยุงตายได้ดีกว่า B. sphaericus SSII-1 โดยเฉพาะเมื่อใช้กับ Cx. pipiens จะมีประสิทธิภาพดีกว่าถึง 30-100 เท่า

de Barjac (1978) ให้ชื่อสายพันธุ์ใหม่นี้ว่า Bacillus thuringiensis var. israelensis de Barjac 1978 serotype H-14 เมื่อนำไปทดลองกับลูกน้ำยุงลาย ในความเข้มข้น 2.4 x 10^4 สปอร์/มล. ทำให้ลูกน้ำยุงตายใน 20-30 นาที โดย B. thuringiensis var. israelensis นี้มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงในอันดับดิพเทอรา (Diptera) มาก

Ignoffo และคณะ (1981 a) ได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ B. thuringiensis สายพันธุ์ HD-1 และ B. thuringiensis var. israelensis แล้ว รายงานว่า B. thuringiensis var. israelensis มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลายและยุงบ้านมาก แต่มีพิษต่อหนอนคืบกะหล่ำปลี (Trichoplusia ni) น้อย

1.1 คุณสมบัติและความเฉพาะเจาะจง

B. thuringiensis var. israelensis เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปแท่ง (rod shape) ต้องการออกซิเจนย้อมติดสีกรัมบวก และสร้างเอ็นโดสปอร์ (endospore) ในขณะเซลสร้างสปอร์จะสร้างผลึกโปรทีนซึ่งเป็นสารพิษเดลต้า-เอ็นโดท็อกซิน (δ -endotoxin) ที่มีความเป็นพิษสูงต่อแมลงในวงศ์คูลิซิดี้ (Culicidae) และวงศ์ซิมัลลิอิดี้ (Simuliidae) Molloy และคณะ (1981) รายงานว่าปัจจัยต่าง ๆ จะมีผลต่อประสิทธิภาพของ B. thuringiensis var. israelensis โดยตัวอ่อน (larva) แมลงในระยะแรกของการเจริญเติบโตมีความไวต่อแบคทีเรียนี้มากกว่าในระยะหลัง และความไวนี้ยังขึ้นกับชนิดของแมลงด้วย นอกจากนั้นยังขึ้นกับอุณหภูมิ วิธีการผลิตในรูปการค้า (commercial microbial insecticide) และปริมาณสารออกฤทธิ์ก็เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ความเป็นพิษแตกต่างกัน Undeen และ Berl (1979) กล่าวว่าการผลิตในรูปสปอร์ซัสเพนชั่น (spore suspension) จะมีความเป็นพิษต่อแมลงสูงเนื่องจากมีขนาดเล็กกว่า แมลงจึงสามารถกินได้มากและเมื่อเข้าไปในทางเดินอาหารแล้วยังย่อยได้ง่ายด้วย และถึงแม้ว่าแบคทีเรียบางส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะตาย แต่สารพิษที่ปล่อยออกมาก็ยังสามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้ นอกจากนี้แบคทีเรียบางส่วนยังสามารถสร้างเซลและสปอร์เพิ่มขึ้น จึงทำให้มีความเป็นพิษมากกว่าการผลิตในรูปผงละลายน้ำ

Mulligan และคณะ (1980) รายงานว่าประสิทธิภาพของ B. thuringiensis var. israelensis จะลดลงเมื่อมีสารแขวนลอยอยู่ด้วย เป็นการสนับสนุนข้อเสนอของ Ramoska (1979) เนื่องจากสารแขวนลอยนั้นเป็นอาหารของลูกน้ำยุงได้ด้วย จึงทำให้ลูกน้ำยุงกินแบคทีเรียได้น้อยลง แต่แสงแดด อุณหภูมิ (10°, 25°, 35°C) และ pH (4.3-10.5) ไม่ทำให้ประสิทธิภาพลดลงแต่อย่างใด

1.2 ปฏิกิริยาของ B. thuringiensis ต่อแมลง

สารพิษซึ่งผลิตโดย B. thuringiensis

1) แอลฟ่า-เอ็กโซท็อกซิน (∝ -exotoxin; phospholipase C; lecithinase)

เอ็นไซม์ตัวนี้มีปฏิกิริยากับเซลหลายชนิดโดยเฉพาะกับฟอสโฟไลปิดที่เยื่อหุ้มเซลซึ่งมีผลทำให้เซลแตกได้ แอลฟ่า-เอ็กโซท็อกซินทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6.6-7.4 แต่ในแมลงที่ pH ของทางเดินอาหารไม่เหมาะสม เช่น ตัวต่อพันเลื่อย (sawfly) เมื่อได้รับพิษเข้าไปเอ็นไซม์นี้จะไม่ทำงานและถูกขับออกในที่สุด ในกรณีที่ pH ของทางเดินอาหารเป็น 10.2-10.5 ซึ่งเหมาะสำหรับการทำงานของเดลต้า-เอ็นโดท็อกซิน ที่ pH นี้จะยับยั้งการงอกของสปอร์ การเจริญของเซล และการสร้างเอ็นไซม์ตัวนี้ จนเมื่อ pH ลดลง แบคทีเรียจึงเริ่มเจริญพร้อมกับผลิตแอลฟ่า-เอ็กโซท็อกซิน แอลฟ่า-เอ็กโซท็อกซินไม่ใช่พิษตัวสำคัญของ B. thuringiensis ซึ่งบางสายพันธุ์จะผลิตได้น้อยมาก หรือไม่ผลิตเลย (Faust 1976)

2) เบต้า เอ็กโซท็อกซิน (B-exotoxin, heatstable exotoxin)

สร้างขึ้นในระยะที่เซลมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว สามารถทนต่อความร้อนที่ 120°C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาทีได้ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 มิลลิไมครอน น.น.โมเลกุล 699.35 ละลายน้ำได้ มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลเหมือนกับนิวคลีโอไทด์ คือประกอบด้วยเบสอดีนีน (adenine) น้ำตาลไรโบสและฟอสเฟต ซึ่งแสดงคุณสมบัติเป็น ATP-analog โดยยับยั้งการทำงานของ RNA-dependent-DNA-polymerase ทำให้เซลสร้าง RNA ไม่ได้ นอกจากนี้ยังทำให้ ATP ไม่สามารถรวมตัวกับเอ็นไซม์เพื่อแยกเป็น AMP และ PO_4^{-3} ได้ เบต้าเอ็กโซท็อกซินจึงเป็นพิษต่อขบวนการเมตาโบลิซึมของเซลรวมทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สารพิษนี้อาจให้ผลทันทีโดยทำให้แมลงตายขณะลอกคราบเป็นดักแด้ หรือเมื่อเป็นดักแด้แล้ว หรืออาจให้ผลระยะยาวเมื่อเป็นตัวโตเต็มวัยแล้ว เบต้าเอ็กโซ-ท็อกซินทำให้เกิดมิโตซิส (mitosis) ผิดพลาดขณะแมลงมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะ (metamorphosis) ดังนั้น B. thuringiensis ที่นำมาใช้เป็นยาฆ่าแมลงจึงต้อง

เลือกสายพันธุ์ที่ผลิตบีต้า-เอ็กโซท็อกซินน้อยหรือไม่ผลิตเลย (Faust 1976) Ohba และคณะ (1981 b) กล่าวว่าการสร้างเบต้า-เอ็กโซท็อกซินนี้เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสายพันธุ์มากกว่าเป็นคุณสมบัติเฉพาะของ serotype

3) แกมม่า-เอ็กโซท็อกซิน (γ -exotoxin)

เป็นเอ็นไซม์ที่ยังไม่ทราบชนิดและกลไกการทำงาน รวมทั้งลักษณะธรรมชาติที่แน่นอน (**Faust 1976.**)

4) เดลต้า-เอ็นโดท็อกซิน (δ - endotoxin หรือ parasporal body)

เป็นผลึกโปรทีนที่เซลสร้างขึ้นพร้อมกับการสร้างสปอร์ ผลึกโปรทีนนี้มีรูปร่างเป็นปิรามิด 2 รูปต่อกันที่ฐาน จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อีเล็คตรอนพบว่าการเรียงตัวของคาร์บอนเป็นแบบเททราโมเลคิวล่า-เฟซ-เซนเตอร์ คิวบิค (tetramolecular face-centered cubic) ขนาด 123 A° โปรทีนเป็นทรงกลมขนาด 87 A°น.น.โมเลกุล 230,000 ไม่ทนต่อความร้อน สลายตัวได้ง่ายและละลายในสารละลายที่เป็นด่าง จากการศึกษาทางชีวเคมีพบว่าเดลต้า-เอ็นโดท็อกซินประกอบด้วยไขมัน คาร์โบไฮเดรท และฟอสฟอรัส นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโน 18 ชนิดซึ่งประกอบด้วยกรดแอสปาติก (aspartic) และกลูตามิค (glutamic) 25 % ของกรดอะมิโนทั้งหมด เดลต้า-เอ็นโดท็อกซิน จะสูญเสียคุณสมบัติในการฆ่าแมลงเมื่อได้รับสารที่ทำให้โปรทีนเสียสภาพ

เมื่อแมลงกินผลึกโปรทีนเข้าไป pH ในทางเดินอาหารที่เหมาะสม ทำให้เอ็นไซม์ย่อยผลึกโปรทีนแล้วปล่อยเดลต้า-เอ็นโดท็อกซินออกมา ความเป็นพิษของสารพิษนี้จะเกิดขึ้นโดยมีผลยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชั่น (Oxidative phosphorylation) ในเซลทางเดินอาหารของแมลง ทำให้ปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นแล้วชักนำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มตามด้วย โดยขบวนการคาตาโบไลติก (katabolytic) มีผลทำให้เกิดขบวนการเมตาโบลิค เรสไพราโตรี่ (metabolic

respiratory) โดยไม่มีการเพิ่ม ATP เมื่อ ATP ถูกจำกัดจะทำให้การถ่ายทอดประจุหยุดลงเป็นเหตุให้ไม่สามารถควบคุมการออสโมซิสได้ ผลสุดท้ายทำให้ไมโครวิลไล (microvilli) ของเซลก็อบเลท (goblet cell) ในเยื่อบุทางเดินอาหารพองและแตกออกในที่สุด เมื่อระบบทางเดินอาหารและระบบโลหิตติดต่อถึงกัน จะมีการปรับ pH ทำให้ pH ในเลือดสูงขึ้น ระยะนี้แมลงจะเกิดอาการอัมพาตขึ้น

เมื่อ pH ในเลือดลดลงจะเป็นสภาพที่เหมาะต่อการเจริญของเซลและการงอกของสปอร์ สปอร์จำนวนมากมายในตัวแมลงนี้เองทำให้มองเห็นเป็นสีขาวเหมือนน้ำนม จึงเรียกอาการของแมลงที่ตายเนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรียนี้ว่า milky disease โดยปกติแมลงมักจะตายก่อนที่เซลของแบคทีเรียจะแทรกเข้าสู่ระบบเลือด (Faust 1976; de Barjac 1978; Tyrell et al. 1979)

5) เลไบล์-เอ็กโซท็อกซิน (Labile exotoxin)

สลายตัวได้ง่ายมาก ไวต่ออากาศ แสงแดด ออกซิเจน จะสลายตัวเมื่อได้รับความร้อน 60°C เป็นเวลา 10-15 นาที เป็นสารประกอบเปปไทด์ที่มี น.น.โมเลกุลต่ำ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 17 ชนิด เป็นกรดแอสปาติก 5.7 % ยังไม่ทราบแน่นอนว่าสารพิษชนิดนี้ผลิตโดย B. thuringiensis หรือเกิดจากขบวนการหมัก (**Faust 1976.**)

6) วอร์เทอร์-โซลูเบิ้ล ท็อกซิน (Water-soluble toxin)

อาการที่ทำให้แมลงเกิดโรคคล้ายกับเดลต้า-เอ็นโดท็อกซิน แต่ลักษณะทางเซรุ่มวิทยาแตกต่างกัน อาจนำสารพิษนี้มาใช้ในการควบคุมแมลงโดยชีววิธีได้ แต่ยังต้องศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมอีก (**Faust 1976.**)

7) เม้าส์-แฟคเตอร์ เอ็กโซท็อกซิน (Mouse factor exotoxin)

เป็นโปรทีนที่ไม่ทนต่อความร้อน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง (**Faust 1976**)

1.3 เสถียรภาพ

เคลต้า-เอ็นโดท็อกซินของ B. thuringiensis var. israelensis สามารถทนต่อความร้อนที่ 80°C เป็นเวลา 8 ช.ม. ได้ หรือให้ความร้อนอย่างรวดเร็ว (heat shock) ที่ 60°C เป็นเวลา 20 นาที หรือโดยวิธีแช่แข็ง-ทำแห้ง (lyophilization) สำหรับการอาบรังสีอุลตราไวโอเล็ต (2537 A°)จะทำให้จำนวนสปอร์ลดลง 1 % วิธีดังกล่าวข้างต้นไม่ทำให้สารพิษนี้เสียประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุง แต่ถ้าให้ได้รับความร้อนถึง 120°C ความดัน 15 ปอนด์ (autoclave) เป็นเวลา 15 นาที จะสูญเสียประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุง (Goldberg and Margalit 1977; WHO/VBC/79.750) เมื่อทดลองเก็บ B. thuringiensis var. israelensis สูตรมาตรฐาน IPS-78 ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (22-27°C) และในตู้เย็นเป็นเวลา 8 เดือน ปรากฏว่าไม่สูญเสียประสิทธิภาพแต่อย่างใด (WHO/VBC/79.750)

จากการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีปัจจุบันพบ B. thuringiensis 19 สายพันธุ์ โดยอาศัยความแตกต่างของเอช-แอนติเจน (H-antigen) ชนิดของเอสเทอร์เรส (esterase) และการสร้างสารพิษชนิดอื่นนอกจากเคลต้า-เอ็นโด-ท็อกซิน (Ohba et.al. 1981 a) Krywienezyk และ Fast (1980) ได้ทดสอบทางเซรุ่มวิทยาแล้วรายงานว่าผลึกโปรทีนที่ผลิตโดย B. thuringiensis var. israelensis มีความสัมพันธ์กับความเป็นพิษต่อแมลง และลักษณะทางเซรุ่มวิทยาต่างจากสายพันธุ์อื่น ๆ

1.4 ประสิทธิภาพของ B. thuringiensis var. israelensis ต่อลูกน้ำยุง

1.4.1 สภาพห้องปฏิบัติการ

Goldberg และ Margalit (1977) ได้ทดลองกับลูกน้ำยุง Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Ae. aegypti, Cx. univittatus และ Cx. pipiens แล้วรายงานว่า Cx. pipiens มีความไวต่อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ที่สุด โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 6×10^3 สปอร์/มล. ส่วน Ae. aegypti และ An. sergentii มีความไวน้อยที่สุด โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 5×10^5 สปอร์/มล.

de Barjac (1978) รายงานว่าที่ความเข้มข้นสูง ๆ จะสามารถฆ่าลูกน้ำยุง Ae. aegypti ได้ในเวลาเพียง 20–30 นาที โดยมีค่า LD_{50} ในเวลา 24 ช.ม. เท่ากับ 2.4×10^4 สปอร์/มล. และฆ่าลูกน้ำยุง An. stephensi ได้ในเวลา 100–110 นาที โดยมีค่า LD_{50} ในเวลา 24 ช.ม. เท่ากับ 9.8×10^4 สปอร์/มล.

Gracia และ Desrochers (1979) ได้ทดลองกับลูกน้ำยุง Ae. sierrensis, Ae. dorsalis, Cx. pipiens complex, Cx. tarsalis, Culiseta incidens และ Cu. inornata ปรากฏว่ามีความเป็นพิษสูงต่อลูกน้ำยุง Cx. tarsalis โดยที่ความเข้มข้น 10^4 เซล/มล. ทำให้ตาย 100 % ส่วน Ae. sierrensis ที่ความเข้มข้นเดียวกันในสภาพกลางแจ้ง (ได้รับแสง 7 ช.ม.) ลูกน้ำยุงจะตาย 73–76 % สภาพที่ร่มตาย 0–10 % แต่ในความเข้มข้น 10^5 เซล/มล. สภาพที่ร่มทำให้ลูกน้ำยุงตาย 100 %

Tyrell และคณะ (1979) รายงานว่าลูกน้ำยุง Ae. aegypti, Cx. quinquefasciatus และ An. albimanus มีค่า LD_{50} ในเวลา 48 ช.ม. เท่ากับ 1.9×10^{-4}, 3.7×10^{-4} และ 8.0×10^{-3} ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ

Ignoffo และคณะ (1981 a) รายงานว่าลูกน้ำยุง Ae. aegypti และ Cx. quinquefasciatus มีค่า LD_{50} เท่ากับ 0.054 และ

0.11 ไมโครกรัม/มล.

1.4.2 สภาพธรรมชาติ

Singer ได้ทดลองในสระซึ่งมีอุณหภูมิ 11° C pH 6.8 ความเค็ม 2.5 % โดยใช้ความเข้มข้น 10 ก.ก/เฮกตาร์ สามารถลดปริมาณของ Ae. detritus ลงได้ (WHO/VBC/79.750)

Hembree (1980) ได้ทดลองโดยใช้ความเข้มข้น 8 ppm. ปรากฏว่าสามารถลดจำนวน Psorophora columbiae ลงได้ 75 %

Mulligan และคณะ (1980) ได้ทดลองในอ่างเก็บน้ำ ปรากฏว่าบริเวณน้ำนิ่งจะได้ผลดีโดยที่ความเข้มข้น 10 ppm. หลังจากนั้น 3 วัน ประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงบริเวณใต้น้ำจะลดลงกว่าผิวน้ำเล็กน้อย แต่จะหมดในเวลา 7 วัน ส่วนบริเวณน้ำไหลจะไม่ค่อยได้ผล เนื่องจากความเข้มข้นเจือจางลง เมื่อทดสอบในทุ่งหญ้าโดยใช้ความเข้มข้น 0.5 ก.ก/เฮกตาร์ จะลดปริมาณ Aedes spp. และ Culex spp. ลงได้ 86-95 % และถ้าใช้วิธีพ่นด้วยความเข้มข้น 1 ก.ก/เฮกตาร์ จะลดปริมาณ Cx. tarsalis ได้ 99 %

1.5 ประสิทธิภาพของ B. thuringiensis var. israelensis ต่อดิพเทอร่าอื่น ๆ

1.5.1 สภาพห้องปฏิบัติการ

Undeen และคณะ (1978, 1979) รายงานว่า Simulium verecundum, Cnephia ornithophilia, C. mutata, S. vittatum และ Prosimulium mixtum มีค่า LC_{50} เท่ากับ $4.4 \times 10^2 - 5.3 \times 10^2$ เซล/มล.

1.5.2 สภาพธรรมชาติ

Gillett ทดลองในแม่น้ำโดยใช้ความเข้มข้น 0.2 มล./ล. ปรากฏว่าสามารถฆ่า S. damnosum complex ได้ในเวลาเพียง 10 นาที

Molloy และ Jamnback (1981) ใช้ Unformulated Bellon Primary Powder ในความเข้มข้น 0.5 ppm. ในแม่น้ำที่อุณหภูมิ 13°C สามารถลดปริมาณ Simulium spp. ได้ 96, 86, 53 และ 11 % ในระยะ 20, 180, 350 และ 705 เมตรตามลำดับ ณ บริเวณที่ทำการทดลองหลังจากนั้น 5 วัน ประสิทธิภาพจะลดลงเพียง 5 % แต่บริเวณใต้น้ำลงมาจะหมดประสิทธิภาพ

Undeenและคณะ (1981) รายงานว่าในความเข้มข้น 2 x 10^5 สปอร์/มล. สามารถฆ่า S. ochraceum ได้ 100 % แต่บริเวณใต้น้ำลงมาจะไม่ได้ผล

1.6 ประสิทธิภาพของ B. thuringiensis var. israelensis ต่อสัตว์ชนิดอื่น ๆ

Gracia และ Goldberg ทดลองโดยใช้ความเข้มข้น 10^7 เซล/มล. ปรากฏว่าไม่มีอาการผิดปกติแต่อย่างใดในพวกครัสตาเซียน (crustacean) พลานาเรีย แต่มีผลบ้างกับหนอนแดง (Chironomid) ในความเข้มข้นต่ำกว่านี้จะไม่มีผล (WHO/VBC/79.750)

เมื่อใช้ความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำยุงตาย 100 % จะไม่มีผลต่อหนอนผีเสื้อ Anagasta kuehniella, Plutella macullipennis, Prodenia litura, Manduca sexta, Trichoplusia ni, Heliothis zea และ H. virescens (de Barjac 1978; Tyrell et al. 1979; Ignoffo et.al. 1981)

เมื่อใช้ความเข้มข้น 10^8 เซล/มล. ที่อุณหภูมิ 20°C และ 4°C จะไม่มีผลต่อชีปะขาว (Ephemeroptera), ด้วงปีกแข็ง (beetle), ไร (mite), หอย (Physa sp.), ไส้เดือนดิน (annelid) และมวนแมงป่องน้ำ (Ranata sp.) (WHO/VBC/79.750)

ในสภาพธรรมชาติเมื่อใช้ความเข้มข้นที่ใช้ควบคุมลูกน้ำยุงจะไม่มีอันตรายต่อด้วงน้ำ (Berosus sp.), ไรน้ำ (Cyclop sp.), ไรน้ำ (Daphnia magna), ตัวอ่อนแมลงปอ (Cordulia sp.), กุ้ง (Aetemta salina), ปลากินลูกน้ำ (Gambusia affinis) และหอยนางรม (Ostrea edulis) (WHO/VBC/79.750)

Molloy และ Jamnback (1981) ได้ทดลองโดยใช้ความเข้มข้น 0.5 ppm. (ซึ่งทำให้ริ้นตำตาย) ในแม่น้ำ ปรากฏว่าไม่เป็นอันตรายต่อชีปะขาว แมลงหนอนปลอกน้ำ (caddisfly), สโตนฟราย (stone fly), หนอนแดง และตัวอ่อนด้วงน้ำ (elmid larva)

Ali (1981) ได้ทดลองโดยใช้ความเข้มข้น 0.25–2.5 ppm. ในสระ และ 0.5 ppm. ในบ่อ ปรากฏว่าลดจำนวนประชากรของหนอนแดงและริ้น (midges) ลง 78–88 % และ 27–65 % ตามลำดับ แต่ในความเข้มข้นสูง ๆ จะไม่เป็นอันตรายต่อโรติเฟอร์ (rotifer), ไรน้ำ (Cyclop sp.), ไรน้ำ (ostracod), มวนกรรเชียง (corixids), มวนวน (notonectids) และด้วงปีกแข็ง (beetle) รวมทั้งสัตว์น้ำอื่น ๆ ด้วย

2. Bacillus sphaericus var. fusiformis สายพันธุ์ 1593

B. sphaericus สายพันธุ์แรกที่พบว่าทำให้ลูกน้ำยุงเป็นโรค คือ สายพันธุ์ "K" ซึ่งแยกออกจากลูกน้ำยุง Culiseta incidens ในรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา (Kellen et al. 1965) ต่อมาในปี ค.ศ.1966 เมื่อองค์การอนามัยโลกสำรวจและแยกเชื้อจุลินทรีย์จากลูกน้ำยุงที่ตาย Dr. Singer (1973; 1974) รายงานว่าพบ B. sphaericus สายพันธุ์ใหม่ในลูกน้ำยุงที่เมืองเดลฮี ประเทศอินเดีย ซึ่งเมื่อทดลองกับลูกน้ำยุง Cx. quinquefasciatus พบว่าสามารถทำให้ลูกน้ำยุงตายได้มากกว่าสายพันธุ์ "K" ถึง 10,000 เท่า

ในปี ค.ศ.1974 Dr. Singerได้แยก B. sphaericus 1593 จากลูกน้ำยุง Cx. quinquefasciatus ในประเทศอินโดนีเซียแล้วนำไปทดลอง

ปรากฏว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าสายพันธุ์ SSII-1 และสามารถนำมาผลิตในรูปการค้า และใช้ได้กว้างขวางกว่าสายพันธุ์ SSII-1 (Singer. 1976; WHO/VBC/80.777)

Davidson และคณะ (1975) ได้ศึกษาการเกิดโรคในลูกน้ำยุง Cx. quinquefasciatus เนื่องจาก B. sphaericus SSII-1 แล้วรายงานว่าการเกิดโรคของลูกน้ำยุงไม่ได้ขึ้นกับปริมาณเซลแบคทีเรียที่ลูกน้ำกิน หรือปริมาณเซลที่ไปแบ่งตัวในทางเดินอาหารของลูกน้ำยุง แต่ขึ้นกับปริมาณของสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ต่อมา Myers และ Yousten (1978) สนับสนุนผลงานของ Davidson และคณะ และรายงานว่าความเป็นพิษนี้ยังไม่ขึ้นกับจำนวนสปอร์ด้วย สารพิษดังกล่าวจะถูกทำลายด้วยความร้อน

Myers และคณะ (1979) ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ B. sphaericus SSII-1 และ 1593 ปรากฏว่าเมื่อทดสอบกับ Cx. quinquefasciatus สายพันธุ์ 1593 จะมีประสิทธิภาพดีกว่าถึง 3,000 เท่า พร้อมทั้งรายงานว่าความเป็นพิษจะเพิ่มขึ้นเมื่อแบคทีเรียเริ่มสร้างสปอร์ และสารพิษซึ่งผลิตจากสายพันธุ์ 1593 จะมีเสถียรภาพมากกว่าสารพิษที่ผลิตจากสายพันธุ์ SSII-1

2.1 คุณสมบัติและความเฉพาะเจาะจง

B. sphaericus เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นรูปแท่ง (rod shape) ต้องการออกซิเจน ย้อมติดสีไม่แน่นอน (gram variable) เคลื่อนที่ได้ มีขนาดกว้าง 0.6–1 ไมครอน ยาว 1.5–5 ไมครอน สร้างเอ็นโดสปอร์ลักษณะกลม B. sphaericus เจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 30°–45° C และอุณหภูมิต่ำสุดที่ 5°–15° C เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่ใช้น้ำตาลกลูโคส หรือแป้งอื่น ๆ ไม่ใช่ไนเตรท DNA ประกอบด้วยกัวนีน (guanine) และไซโตซีน (cytocine) ประมาณ 34–37 โมลเปอร์เซนต์ (moles %) สามารถแบ่ง B. sphaericus ได้ตามลักษณะ DNA homology ได้เป็น 5 กลุ่ม B. sphaericus 1593 และสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ทำให้เกิดโรคเป็นปาราสิตชั่วคราว (facultative parasites) และแซโปรไฟต์ (saprophytes) ในการเจริญเติบโตของ B. sphaericus

1593 ต้องการไบโอติน (biotin) ไทมีน (thiamine) และกรดอะมิโน 6 ชนิดคือ ลูซีน (leucine) วาลีน (valine) ไอโซลูซีน (isoleucine) เมทไทโอนีน (methionine) ไลซีน (lysine) และกลูตามิค (glutamic) ซึ่งเป็นแหล่งให้คาร์บอน และไนโตรเจน (WHO/VBC/80.777)

B. sphaericus 1593 มีความไวมากต่อยาเพนนิซิลิน (penicillin) และเททราไซคลิน (tetracycline) ในระดับต่ำ (50-100 ไมโครกรัม/มล.) แต่มีความต้านทานต่อคลอแรมเฟนนิคอล (chloramphenicol) หรือสเตร็ปโตไมซีน (streptromycine) ทั้งในระดับสูงและต่ำ (WHO/VBC/80.777)

B. sphaericus 1593 มีความเป็นพิษสูงต่อลูกน้ำยุง Culex spp. ส่วน Aedes spp. ขึ้นอยู่กับชนิดลูกน้ำ สำหรับ Anopheles spp. ความเป็นพิษนอกจากจะแตกต่างตามชนิดของลูกน้ำยุงแล้ว ยังแตกต่างตามสายพันธุ์ด้วย จากการทดลองของ Ramoska และ Hopkins (1981) ศึกษาพฤติกรรมการกินอาหารของลูกน้ำยุง ปรากฏว่าช่วงระยะเวลาแรก (10 นาที) Cx. quinquefasciatus กินแบคทีเรียมากกว่า An. albimanus มากทำให้อัตราการตายของลูกน้ำยุง Cx. quinquefasciatus สูงกว่า An. albimanus มาก,เมื่อเวลาผ่านไป 2 ช.ม.แม้ว่า An. albimanus จะกินแบคทีเรียในปริมาณใกล้เคียงกัน Cx. quinquefasciatus แต่อัตราการตายก็ยังคงต่ำ ส่วนลูกน้ำยุง Ae. aegypti แม้ปริมาณการกินแบคทีเรียจะใกล้เคียงกับ Cx. quinquefasciatus แต่อัตราการตายก็ยังต่ำมาก ทำให้สันนิษฐานว่าความเฉพาะเจาะจงของแบคทีเรียนี้ นอกจากจะขึ้นกับพฤติกรรมการกินอาหารของลูกน้ำยุงแล้ว ยังขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ ด้วย

2.2 ปฏิกิริยาของ B. sphaericus ต่อแมลง

B. sphaericus เข้าสู่ลูกน้ำยุงทางทางเดินอาหารเช่นเดียวกับ B. thuringiensis จากการศึกษาของ Hopkins และ Ramoska (1981) โดยใช้ ^{14}C ศึกษาการกินแบคทีเรียของลูกน้ำยุง พบว่าในช่วง 30 นาทีแรกอัตราการกินของลูกน้ำยุงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นอัตราการกินที่เพิ่มขึ้นจะลดลง

007140

ความเป็นพิษของ B. sphaericus มีมากที่สุดในระยะปลายของสเตชันนารี่ เฟส (stationary phase) ซึ่งเป็นระยะที่กำลังสร้างสปอร์ จนกระทั่งได้สปอร์ที่โตเต็มที่ สารพิษนี้จะถูกปล่อยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และถ้าให้ความร้อนที่ 70°C ความเป็นพิษจะเพิ่มขึ้น สันนิษฐานว่าเกิดจากความร้อนนั้นทำให้เซลแตกและปล่อยสารพิษออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่แบคทีเรียสามารถผลิตสารพิษได้มากที่สุดคือที่ 30°C หรือต่ำกว่าเล็กน้อย เมื่อทดลองเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ (42°C) ปรากฏว่าแม้จะไม่มีผลต่อการเจริญของเซลแบคทีเรียแต่จะผลิตสารพิษได้ปริมาณน้อยลง (Subramanian et al. 1980.)

การศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อีเล็คตรอนเพื่อหาตำแหน่งของสารพิษ ปรากฏว่าไม่พบอินคลูชั่น (inclusion) ที่แสดงว่าเป็นตำแหน่งของสารพิษ แสดงว่า B. sphaericus 1593 ไม่ผลิตพาราสปอรอล คริสตอล (Myers et al.1979.) เมื่อนำเซลในระยะกำลังสร้างสปอร์มาแยกเป็นส่วนต่าง ๆ เพื่อศึกษาตำแหน่งการสร้างสารพิษ ปรากฏว่าบริเวณผนังเซลมีความเป็นพิษมากที่สุด (LC_{50} = 2.8 ng/ml.) อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับสปอร์ที่โตเต็มที่แล้ว ปรากฏว่าความเป็นพิษของสปอร์มีมากกว่าถึง 10 เท่า (LC_{50} = 0.37 ng/ml.) โดย Myers และ Yousten (1980) ให้ข้อเสนอแนะว่า ส่วนที่เป็นพิษในผนังเซลต่อมาจะกลายเป็นส่วนประกอบของสปอร์ สำหรับความเป็นพิษที่เกิดจากสปอร์ ตำแหน่งที่ผลิตสารพิษยังไม่ทราบแน่ เนื่องจากการศึกษารายละเอียดของสารพิษซึ่งผลิตจาก B. sphaericus 1593 นี้ยังไม่มากพอ รายละเอียดทางชีวเคมีและปฏิกิริยาที่แน่นอนก็ยังไม่ทราบ สันนิษฐานว่าสารพิษนี้อาจประกอบด้วยสารพิษสองชนิด หรือมากกว่านี้ก็ได้ (WHO/VBC/80.777)

สารพิษจาก B. sphaericus 1593 นี้ละลายได้ดีใน Na_2CO_3 และจะละลายได้ดียิ่งขึ้นเมื่อมีน้ำย่อยจากทางเดินอาหาร (gut enzyme) อยู่ด้วย (Subramanian et al. 1980.)

2.3 เสถียรภาพ

B. sphaericus 1593 สามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลา 4 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง (21-22°C), -20°C และ -80°C โดยไม่สูญเสียประสิทธิภาพแต่อย่างใด สารพิษจากแบคทีเรียนี้สามารถทนต่อการแช่แข็ง (freezing) และวิธีแช่แข็ง-ทำแห้ง ส่วนความร้อนที่ 80°C (12 นาที) และการอาบรังสีอุลตราไวโอเล็ต (30 นาที) ทำให้ประสิทธิภาพลดลงเล็กน้อย แต่ความร้อนที่สูงกว่า 80°C หรือ NaOH 0.01 N (20°C ; 30 นาที) จะทำลายประสิทธิภาพของสารพิษนี้ (Myers and Yousten 1980; Subramanian et al. 1980; WHO/VBC/80.777.)

2.4 ประสิทธิภาพของ B. sphaericus 1593 ต่อลูกน้ำยุง

2.4.1 สภาพห้องปฏิบัติการ

ลูกน้ำยุงที่มีความไวต่อ B. sphaericus 1593 ได้แก่ Culex spp. และ Cu. melanura (WHO/VBC/80.777) Mulligan และคณะ (1978) รายงานว่าค่า LC_{50} ของ Ae. nigromaculis ระยะที่ 1 , Cx. quinquefasciatus ระยะที่ 2 และ Cx. tarsalis ระยะที่ 2 มีค่าเท่ากับ 470, 150 และ 27 เซล/มล. เมื่อใช้ความเข้มข้น 100 มล./ล. ปรากฏว่าทำให้ลูกน้ำยุง Ae. aegypti ตาย 21 % และ An. stephensi ตาย 98-100 % (WHO/VBC/80.777)

2.4.2 สภาพธรรมชาติ

Mulligan และคณะ (1978) ได้ทดลองโดยใช้ความเข้มข้น 10^4 เซล/มล. ปรากฏว่าสามารถควบคุม Cx. tarsalis และ Cx. quinquefasciatus ได้ผลดี

Ramoska และคณะ (1978) ได้ทดลองโดยใช้ความเข้มข้น 3.1×10^4-1.9×10^3 เซล/มล. ปรากฏว่าสามารถควบคุม Cx. nigripalpus และ Psorophora columbiae ได้ผลดี

Mulligan และคณะ (1980) รายงานว่าอุณหภูมิ (10°, 25°, 35°C) ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารพิษ แต่ถ้าได้รับแสงโดยตรงจากดวงอาทิตย์ประสิทธิภาพจะลดลงเล็กน้อย ส่วน pH จะมีผลต่อประสิทธิภาพของสารพิษ กล่าวคือในความเข้มข้นเดียวกันที่ pH 10.5 ไม่ทำให้ลูกน้ำยุงตาย แต่ที่ pH 9.2 ทำให้ลูกน้ำยุงตาย 100 %

Davidson และคณะ (1981) ทดลองใช้ความเข้มข้น 1 และ 2 ก.ก./เฮกตรา ปรากฏว่าสามารถฆ่า Cx. quinquefasciatus, Cx. annulirostris และ An. annulipes ได้ผลดี

2.5 ประสิทธิภาพของ B. sphaericus 1593 ต่อสัตว์ชนิดอื่น ๆ

2.5.1 แมลงและสัตว์น้ำอื่น ๆ

Mulligan และคณะ (1978) รายงานว่าที่ความเข้มข้น 10^5 เซล/มล. ไม่มีผลต่อครัสตาเซี่ยน (Crustacean) เช่นไรน้ำ (Cyclops vernalis), Moina spp., Cypris spp., Ceriodaphnia spp. แมลงอื่น ๆ เช่น ชีปะขาว (Callibaetis spp.) หรือหนอนแดง (Chironomus stigmaterus) รวมทั้งปลากินลูกน้ำยุง (Gambusia affinis affinis)

ในความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำยุงตายจะไม่มีผลต่อสัตว์น้ำต่าง ๆ ได้แก่มวน (Epiplatys bifasciatus), มวนกรรเชียง (Corixids), ตัวอ่อนแมลงปอเข็ม (damsel fly naiads), แมลงปอ (Libellulidae), แมลงวันผลไม้ (fruit fly) ริ้นดำ (Simulium vittatum) หนอนแดง (Chironomus stigmaterus) ชีปะขาว (Callibaetis spp.) พวกหนอนผีเสื้อ (Plodia interpunctella) รวมทั้งพวกกุ้งน้ำจืด (Orconectes rusticus) หรือปลากินลูกน้ำ Aphyosemion gardneri และ Gambusia (WHO/VBC/80.777)

2.5.2 สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและอื่น ๆ

เมื่อฉีด B. sphaericus 1593 ให้สัตว์ทดลองซึ่งได้แก่ หนู (mice) กระต่าย และหนูตะเภา โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือด (intravenous) ใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ช่องท้อง (intraperitoneal) หรือสมอง (intracerebral) ตลอดจนการผสมในอาหาร หรือพ่นในอากาศให้ได้รับทางลมหายใจ ก็ไม่ปรากฏว่ามีผลทำให้สัตว์ทดลองป่วย หรือแสดงพฤติกรรมผิดปกติแต่อย่างใด อัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ทดลองยังคงปกติอยู่เช่นเดิม เมื่อฉีดเข้าสมองหรือเยื่อบุตาด้วยความเข้มข้นที่สูง ๆ ทำให้เกิดการอักเสบเล็กน้อยซึ่งเกิดจากสิ่งแปลกปลอมเข้าไปรบกวนนั่นเอง (WHO/VBC/80.777)

Hudson (1981) ได้ทดลองกับสัตว์เลื้อยคลาน Anolis spp. โดยฉีดแบคทีเรียเข้าทางช่องท้อง พ่นในอากาศ และผสมในอาหาร สัตว์เลื้อยคลานจะไม่แสดงอาการป่วยแต่อย่างใด และเมื่อตรวจดูตับพบว่าแบคทีเรียจะถูกทำลายไปเรื่อย ๆ และหลังจากที่ฉีดเข้าทางช่องท้องแล้วเป็นเวลา 37 วัน จะตรวจไม่พบแบคทีเรียในตับเลย.