BRT 539024

การสำรวจหาประสิทธิภาพของสายพันธุ์ต่าง ๆ ของ BACILLUS THURINGIENSIS ในการควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก ACHROIA GRISELLA และหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ GALLERIA MELLONELLA

นายสุรชัย ลีพิทักษ์รัตน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-816-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
c/o ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

การสำรวจหาประสิทธิภาพของสายพันธุ์ต่างๆ ของ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* และหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella*

นายสุรชัย ลีพิทักษ์รัตน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-816-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INVESTIGATION OF THE EFFICACY OF VARIOUS STRAINS OF *Bacillus thuringiensis* ON THE LESSER WAX MOTH *Achroia grisella* AND THE GREATER WAX MOTH, *Galleria mellonella*

Mr. Surachai Leephitakrat

A Thesis is Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-636-816-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสำรวจหาประสิทธิภาพของสายพันธุ์ต่างๆของ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* และหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella*

โดย นายสุรชัย ลีพิทักษ์รัตน์

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. เกรียงไกร เลิศทัศนีย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร. เกรียงไกร เลิศทัศนีย์)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ตังคณะสิงห์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว BRT 539.1

สุรชัย ลีพิทักษ์รัตน์ : การสำรวจหาประสิทธิภาพของสายพันธุ์ต่างๆ ของ *Bacillu thuringiensis* ในการควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* และหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* (INVESTIGATION OF THE EFFICACY OF VARIOUS STRAINS OF *Bacillus thuringiensis* ON THE LESSER WAX MOTH *Achroia grisella* AND THE GREATER WAX MOTH *Galleria mellonella* อ. ที่ปรึกษา : ศ.ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. เกรียงไกร เลิศทัศนีย์ , 92 หน้า ISBN 974-636-816-8

ผลการทดสอบความเป็นพิษของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก (*Achroia grisella*) และหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella*) จากจำนวนทั้งหมด 27 สายพันธุ์ ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยวิธีการให้หนอนกิน พบแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* 3 สายพันธุ์ ที่มีผลต่อผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดเล็กได้แก่ *Bacillus thuringiensis dendrolimus*, *Bacillus thuringiensis kurstaki* และ *Bacillus thuringiensis entomoeidus* จากการศึกษาความเป็นพิษ *Bacillus thuringiensis* แต่ละสายพันธุ์ ในอาหารเทียม พบว่า ค่า LC_{50} (48 ชั่วโมง) เท่ากับ 0.34 และ 1.64% (W/W) ใน *Bacillus thuringiensis kurstaki* เท่ากับ 0.25 และ 0.65% (W/W) ใน *Bacillus thuringiensis entomocidus* เท่ากับ 0.45 และ 0.51% (W/W) ใน *Bacillus thuringiensis dendrolimus* ของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ 1-2 และ 3-4 ตามลำดับ และเท่ากับ 1.02 และ 1.29% (W/W) ใน *Bacillus thuringiensis kurstaki* เท่ากับ 0.17 และ 0.48% (W/W) ใน *Bacillus thuringiensis entomocidus* และเท่ากับ 0.76 และ 1.13% (W/W) ใน *Bacillus thuringiensis dendrolimus* ของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ ระยะ 1-2 และ 3-4 ตามลำดับ

การทดสอบความเป็นพิษที่ทดลองในรวงรังผึ้งพบว่า ค่า LC_{50} (48 ชั่วโมง) เท่ากับ 2.72 และ 11.51 กรัม/ลิตร ใน *Bacillus thuringiensis kurstaki* เท่ากับ 0.11 และ 0.86 กรัม/ลิตร ใน *Bacillus thuringiensis entomocidus* และเท่ากับ 0.004 และ 0.28 กรัม/ลิตร ใน *Bacillus thuringiensis dendrolimus* ของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ 1-2 และ 3-4 ตามลำดับ และเท่ากับ 9.20 และ 5.38 กรัม/ลิตร ใน *Bacillus thuringiensis kurstaki* 0.07 และ 0.18 กรัม/ลิตร ใน *B. thuringiensis* var. *entomocidus* และเท่ากับ 3.98 และ 4.54 กรัม/ลิตร ใน *Bacillus thuringiensis dendrolimus* ของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ระยะ 1-2 และ 3-4 ตามลำดับ

การเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง พบว่าหนอนผีเสื้อไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยที่ความเข้มข้น 0.3 % ใน *Bacillus thuringiensis entomocidus* และ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และที่ความเข้มข้น 0.4 % ใน *Bacillus thuringiensis kurstaki* ของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ 1-2 และที่ความเข้มข้น 0.4% ใน *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และ *Bacillus thuringiensis kurstaki* และที่ความเข้มข้น 0.1% ใน *Bacillus thuringiensis entomocidus* ของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ระยะ 1-2

การทดสอบต่อหนอนของผึ้งโพรง *Apis cerana* อายุ 3 วัน ที่ความเข้มข้น 10% โดยพบว่าไม่มีอัตราการตายที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญต่อกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C626931 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: *Bacillus thuringiensis* / *Achroia grisella* / *Gallaria mellonella* / TOXICITY

SURACHAI LEEPITAKRAT : INVESTIGATION OF THE EFFICACY OF VARIOUS STRAINS OF *Bacillus thuringiensis* ON THE LESSER WAX MOTH *Achroia grisella* AND THE GREATER WAX MOTH *Galleria mellonella*. THESIS ADVISOR : PROF.SIRIWAT WONGSIRI, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : KRIANGKRAI LERDTHUSANEE, Ph.D. 92 pp. ISBN 974-636-816-8.

Activity of 27 strains of *Bacillus thuringiensis* against the lesser wax moth , *Achroia grisella* and Greater wax moth, *Galleria mellonella* were determined in the laboratory by a feeding method. Only 3 out of 27 strains of *Bacillus thuringiensis kurstaki*, *Bacillus thuringiensis entomcidus* and *Bacillus thuringiensis dendrolimus* were toxic to the larvae of wax moths. The toxicity of *Bacillus thuringiensis* by feeding the larvae on artificially treated media was: LC_{50} (48 hr.) of *Bacillus thuringiensis kurstaki* were 0.34 and 1.64 % (w/w), *Bacillus thuringiensis entomocidus* were 0.25 and 0.65 % (w/w) and *Bacillus thuringiensis dendrolimus* were 0.45 and 0.51 % (w/w) for the first to second instars and third to fourth instars of *Achroia grisella*, respectively. The LC_{50} (48 hr.) of *Bacillus thuringiensis kurstaki* were 1.02 and 1.29% (w/w), *Bacillus thuringiensis entomocidus* were 0.17 and 0.48 % (w/w) and *Bacillus thuringiensis dendrolimus* were 0.76 and 1.13 % (w/w) for the first to second instars and third to fourth instars of *Galleria mellonella* respectively.

The toxicity of *Bacillus thuringiensis* to wax moths was also studied by feeding larvae on treated wax comb. The LC_{50} (48 hr.) of *Bacillus thuringiensis kurstaki* were 2.72 and 11.81 g/l., *Bacillus thuringiensis entomocidus* were 0.11 and 0.86 g/l. and *Bacillus thuringiensis dendrolimus* were 0.004 and 0.28 g/l. for the first to second instars and third to fourth instars of *Achroia grisella*, respectively. The LC_{50} (48 hr.) of *Bacillus thuringiensis kurstaki* were 9.20 and 5.38 g/l, *Bacillus thuringiensis entomocidus* were 0.07 and 0.18 g/l. and *Bacillus thuringiensis dendrolimus* were 3.98 and 4.54 g/l for the first to second instars and third to fourth instars of *Galleria mellonella*, respectively.

Delayed effects of sublethal dosages on adult emergence was studied by feeding larvae on artificial media treated with the bacteria. The first to second instars and third to fourth instars of *Achroia grisella* did not develop to adult stage in media treated with 0.3 % of *Bacillus thuringiensis entomocidus* and *Bacillus thuringiensis dendrolimus* , 0.4 % of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. The first to second instars and third to fourth instars of *Galleria mellonella*, and 0.4 % of *Bacillus thuringiensis dendrolimus* and *Bacillus thuringiensis kurstaki* and 0.1 % of *Bacillus thuringiensis entomocidus*.

Toxicity on the larvae of *Apis cerana* was also tested. There was no significant activity on the larvae at the concentration of 10.0 % (W/W) at 24 , 48 and 72 hr. when compare with control groups.

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยความกรุณา และความช่วยเหลือจากคณาจารย์ และบุคลากรหลายท่าน ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ศาสตราจารย์ ดร.สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนย์ และ ดร.เกรียงไกร เลิศทัศนีย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งได้ควบคุมงานวิจัย และ ให้คำแนะนำ เพื่อแก้ไขข้อบกพร่องในด้านต่างๆ จนประสบความสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ตังคณะสิงห์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ รศ. จริยา เล็กประยูร ที่ได้เอื้ออำนวยสถานที่ และความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการกองกีฏวิทยาทางแพทย์ คุณประคอง พันธ์อุไร คุณวิชัย งามสุข จากกองกีฏวิทยาทางแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้ให้คำแนะนำ และเอื้ออำนวยสถานที่ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ หน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้ง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้สถานที่และอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณ วริษา ตั้งใจจริง และ สุชาติ เทพนิมิตร ที่ได้ช่วยเหลือในการพิมพ์วิทยานิพนธ์ และค้นคว้าเอกสาร คุณพุทธลักษณ์ ไชประภาย คุณจันทิมา ปิยะพงษ์ และพี่ๆน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือตลอดจนให้กำลังใจต่อผู้เขียนเป็นอย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโครงการพัฒนาองค์ความรู้ และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ/สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งชาติ(รหัสโครงการ BRT 539024) ที่ได้ร่วมให้ทุนในการศึกษาครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครู-อาจารย์ ทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนข้าพเจ้า และผู้ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการศึกษามาตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

บทที่

1. บทนำ 1

2. บทสอบสวนเอกสาร 4

3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 27

4. ผลการทดลอง 38

5. วิจารณ์ผลการทดลอง 69

6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 73

เอกสารอ้างอิง 75

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. 83

ภาคผนวก ข. 87

ประวัติผู้เขียน 92

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 การควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งที่อุณหภูมิต่ำในระยะเวลาต่างๆ 11
2.2 เปอร์เซนต์การตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่จากการใช้สาร EDB และ PDB ที่อุณหภูมิต่างๆ 12
2.3 การจัดจำแนกของ *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes 19
2.4 แสดงลำดับของยีนที่สร้างผลึกโปรตีนในแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆ 20
4.1 อัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achoia grisella* ระยะ 1-2 ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 % 39
4.2 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achoia grisella* ระยะ 1-2 ในอาหารเทียม 41
4.3 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achoia grisella* ระยะ 3-4 ในอาหารเทียม 42
4.4 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะ 1-2 ในอาหารเทียม 47
4.5 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะ 3-4 ในอาหารเทียม 48
4.6 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achoia grisella* ระยะ 1-2 ในรวงรังผึ้ง 53
4.7 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achoia grisella* ระยะ 3-4 ในรวงรังผึ้ง 54
4.8 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะ 1-2 ในรวงรังผึ้ง 59
4.9 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะ 3-4 ในรวงรังผึ้ง 59
4.10 ความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผึ้งโพรง *Apis cerana* 63

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แสดงวงจรชีวิตของผีเสื้อหนอนกินไขผึ้ง	6
2.2	ตัวเต็มวัยของผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* F.	7
2.3	ตัวเต็มวัยของผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* L.	7
2.4	รวงรังผึ้งที่ยังไม่ได้ถูกหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งทำลาย	8
2.5	รวงรังผึ้งที่ถูกหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งเข้าทำลาย	8
2.6	ภาพถ่ายอิเล็กตรอนแสดง sporangium ของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*	21
3.1	หนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* F. ระยะ 1-2 และ 3-4	34
3.2	หนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* L. ระยะ 1-2 และ 3-4	34
3.3	รวงรังผึ้งที่ใช้ในการทดลอง	35
3.4	อาหารสำหรับใช้ในการทดลอง	35
3.5	ลักษณะแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ใช้ในการทดลอง	36
3.6	ลักษณะการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กที่กิน *Bacillus thuringiensis entomocidus*	36
4.1	เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ระยะ 1-2 ในอาหารเทียม ของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	44
4.2	เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ระยะ 3-4 ในอาหารเทียม ของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	45
4.3	เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะ 1-2 ในอาหารเทียม ของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	50
4.4	เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะ 3-4 ในอาหารเทียม ของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	51

ภาพที่ หน้า

4.5 เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ระยะ 1-2 ในรวงรังผึ้ง ของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง 56

4.6 เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ระยะ 3-4 ในรวงรังผึ้ง ของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง 57

4.7 เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะ 1-2 ในรวงรังผึ้ง ของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง 63

4.8 เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะ 3-4 ในรวงรังผึ้ง ของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง 64

4.9 เปรียบเทียบความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง ขนาดเล็ก *Achroia grisella* ที่ 48 ชั่วโมง ในอาหารเทียม 68

4.10 เปรียบเทียบความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง ขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ที่ 48 ชั่วโมง ในอาหารเทียม 69

4.11 เปรียบเทียบความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง ขนาดเล็ก *Achroia grisella* ที่ 48 ชั่วโมง ในรวงรังผึ้ง 70

4.12 เปรียบเทียบความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง ขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ที่ 48 ชั่วโมง ในรวงรังผึ้ง 71

บทที่ 1

บทนำ

ผีเสื้อหนอนกินไขผึ้ง (wax moth) เป็นศัตรูสำคัญของผึ้งชนิดหนึ่งโดยหนอนผีเสื้อจะเข้าไปทำลายแผ่นรวงรังของผึ้ง โดยเฉพาะในรังผึ้งที่อ่อนแอและคอนเก่าที่เก็บในโรงเก็บ ซึ่งพบว่ามีการทำลายทั้งในรังผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) และผึ้งโพรง (*Apis cerana*) (สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, 2532) ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งเป็นจำนวนมาก ในทวีปอเมริกา, ยุโรป และเอเชีย (Morse, 1978 ; Singh, 1962) และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการทิ้งรังของผึ้งโพรงในประเทศไทย ประโยชน์ของผึ้งนอกจากจะให้ผลผลิตทางอุตสาหกรรม เช่น น้ำผึ้ง เกสรดอกไม้ ไขผึ้ง และรอยัลเยลลี่ แล้วยังช่วยในการผสมเกสรดอกไม้ในพืชผลไม้เศรษฐกิจหลายชนิด (Wongsiri and Chen, 1995) มูลค่าความเสียหายจากการทำลายของผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งยังไม่มีการประเมินที่แน่ชัดในประเทศไทย สำหรับประเทศสหรัฐอเมริกามูลค่าความเสียหายจากการทำลายของผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่ประมาณสามล้านดอลล่าร์ในปีค.ศ. 1973 และเพิ่ม เป็นสี่ล้านดอลล่าร์ในปี ค.ศ. 1976 (Williams, 1976) เนื่องจากปัจจุบันปัญหาการระบาดของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งมีความรุนแรงมากขึ้น จึงมีการนำสารเคมีมาใช้ป้องกันกำจัดในรูปสารรมควันประเภทต่างๆ (Burges, 1978; Trembley and Burgett, 1979; Singh, 1962)

การใช้สารเคมีในปริมาณที่มากเกินไปก่อให้เกิดความเสียหายหลายประการ ทั้งต่อสุขภาพผู้ใช้ ผู้บริโภคและต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงส่วนใหญ่มิได้เป็นพิษต่อแมลงเท่านั้น ยังเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ รวมทั้งมนุษย์ด้วย นอกจากนั้นยังพบว่าแมลงหลายชนิดสามารถต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย (Burges, 1976; Napompeth, 1989) ดังนั้นเพื่อต้องการลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดแมลง จึงได้มีการนำวิธีการควบคุมประชากรของแมลงศัตรูพืชและแมลงพาหะนำโรคโดยทางชีวภาพ (biological control) ซึ่งได้รับการส่งเสริมให้ทดแทนหรือควบคู่กับวิธีควบคุมโดยใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลง

การใช้จุลินทรีย์ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช (microbial control) เป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์ในการป้องกันกำจัดแมลงแต่ละชนิดมีความจำเพาะเจาะจงสูงมาก คือสามารถที่จะฆ่าแมลงได้เฉพาะแมลงบางประเภทเท่านั้น แต่ไม่ทำอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น คน สัตว์ หรือแม้แต่แมลงประเภทอื่นๆที่มีประโยชน์ (Aronson, Beckman and Dunn, 1986)

ปัจจุบันได้มีการควบคุมแมลงศัตรูโดยวิธีทางชีวภาพมากขึ้น โดยเฉพาะการใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ซึ่งมีคุณสมบัติในการผลิต delta-endotoxin หรือ crystal protein ในขณะที่มีการสร้างสปอร์ทำให้มีความเป็นพิษต่อแมลง (Norris, 1971) ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถกำจัดแมลงได้มากกว่า 167 ชนิดในอันดับต่างๆ เช่น Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera และ Coleoptera ทั้งมีความปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์มีกระดูกสันหลัง และพืช (Facon, 1971)

เนื่องจากได้มีการใช้ *Bacillus thuringiensis* เป็นจุลินทรีย์ป้องกันกำจัดแมลงมานานกว่า 20 ปีแล้วก็ตาม แต่ยังขาดปัจจัยหลายอย่างที่ใช้ในการสนับสนุนต่อการประยุกต์ใช้ *Bacillus thuringiensis* เนื่องจากความเป็นพิษของ crystal protein มีความเฉพาะต่อแมลงแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน การใช้ *Bacillus thuringiensis* ในการกำจัดแมลงจะต้องมีความจำเพาะต่อแมลงชนิดนั้นเพื่อให้ crystal protein แสดงความเป็นพิษออกมา (Yamamoto and Powell, 1993) การสร้าง crystal ของ *B. thuringiensis* ในแต่ละสายพันธุ์มีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ดังนั้นความสำเร็จของการใช้เชื้อแบคทีเรียในการควบคุมแมลงศัตรูจึงขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ที่นำมาใช้ เพราะฉะนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาสายพันธุ์ต่างๆ ของแบคทีเรีย ซึ่ง *Bacillus thuringiensis* สามารถแบ่งออกเป็น subspecies หรือ varities ได้ถึง 30 varities จากการจำแนกโดยการใช้ serological และคุณสมบัติทางเคมี ปัจจุบันได้มีการใช้แบคทีเรียในการควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (greater wax moth) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และได้มีบริษัทผลิตออกมาเป็นการค้า เช่น Certan®, Thuricide® และ Bactur® เป็นต้น (Cantwell, 1980) เนื่องจากผลิตภัณฑ์เหล่านี้ถูกพัฒนาและผลิตจากต่างประเทศทั้งสิ้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการพัฒนาจากต่างประเทศ จะเหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในต่างประเทศเป็นส่วนใหญ่ และที่สำคัญที่สุดคือสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* ไม่เหมาะสมกับชนิดของแมลงที่ระบาดในประเทศไทย ผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการทางด้านเทคโนโลยีทางชีวภาพ ส่วนใหญ่จะต้องมีการพัฒนาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมควบคู่กันไปด้วยเสมอ การใช้ *Bacillus thuringiensis* เพื่อเป็นสารฆ่าแมลงจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสม ที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงสูงหรือสายพันธุ์ที่สร้างผลึกสารพิษในปริมาณมาก และสามารถคงทนอยู่ในธรรมชาติได้นาน เนื่องจากไม่มีรายงานการศึกษาถึงวิธีการควบคุมผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดเล็ก (*Achroia grisella* F.) ซึ่งมีความสำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งในประเทศไทยด้วย ดังนั้นจึงนับเป็นวัตถุประสงค์หลักของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์และความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ในการป้องกันกำจัดผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดเล็ก และผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่ให้ได้ผลยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กและหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่

2. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* ที่มีต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กและหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่

ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการคัดเลือกหาสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* จากจำนวนทั้งหมด 27 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงขึ้นมาในห้องปฏิบัติการ เพื่อหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก และศึกษาความเป็นพิษของสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่มีต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กและหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ ในระยะ 1-2 และ 3-4 โดยวิธีการผสมแบคทีเรียลงในอาหารเทียมและนำรวงรังผึ้งที่จุ่มด้วยแบคทีเรียให้ตัวหนอนกิน (feeding method) พร้อมกับเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษ (LC_{50}) ของแต่ละสายพันธุ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพมาใช้ในการป้องกันกำจัดหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งทดแทนการใช้สารเคมี

2. เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่นำมาศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์และปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งต่อไป

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 วงษ์ศิริ 2532)

การจัดเรียงลำดับชั้น(classification)ของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่และหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้

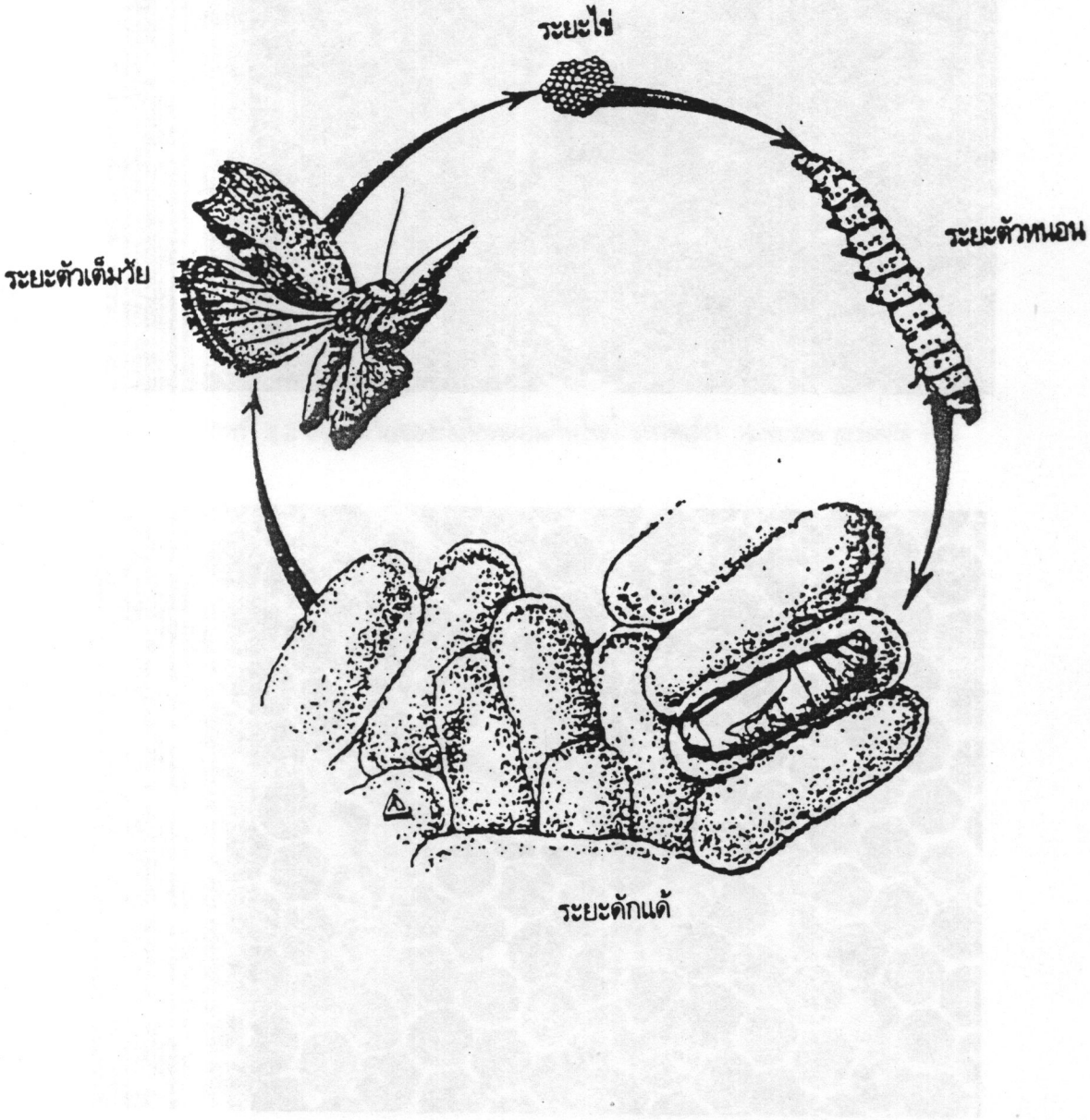
อาณาจักร (Kingdom)	Animalia
ไฟลัม (Phylum)	Arthropoda
ชั้น (Class)	Insecta
อันดับ (Order)	Lepidoptera
วงศ์ (Family)	Pyralidae
สกุล (Genus)	*Galleria*
	Achroia
สปีชีส์ (Species)	*Galleria mellonella* Linn.
	Achroia grisella Fabr.

การแพร่กระจาย

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

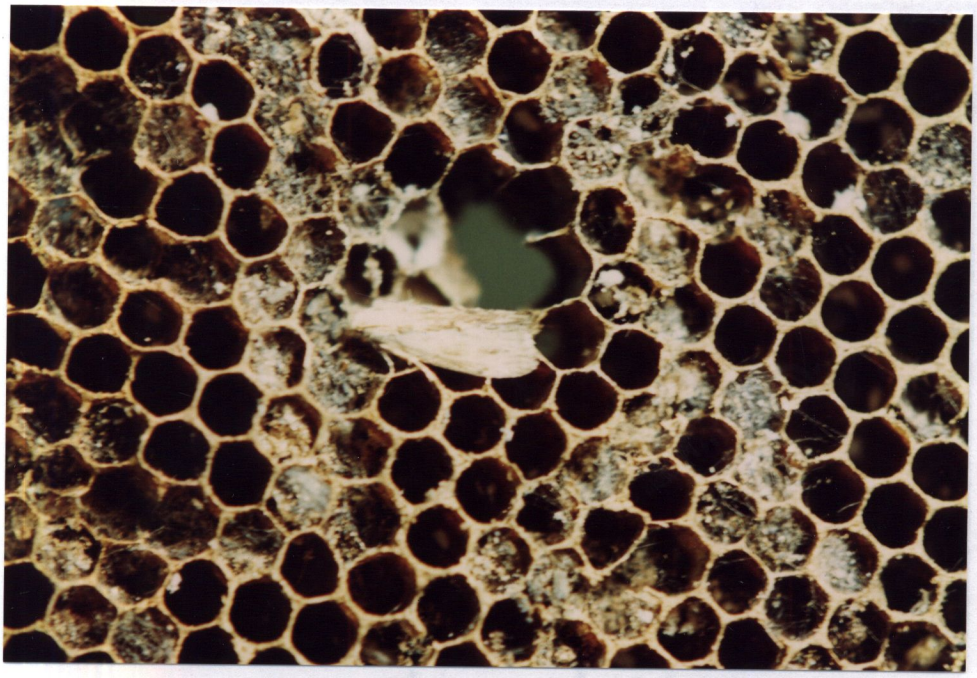
ลักษณะทั่วไป

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)

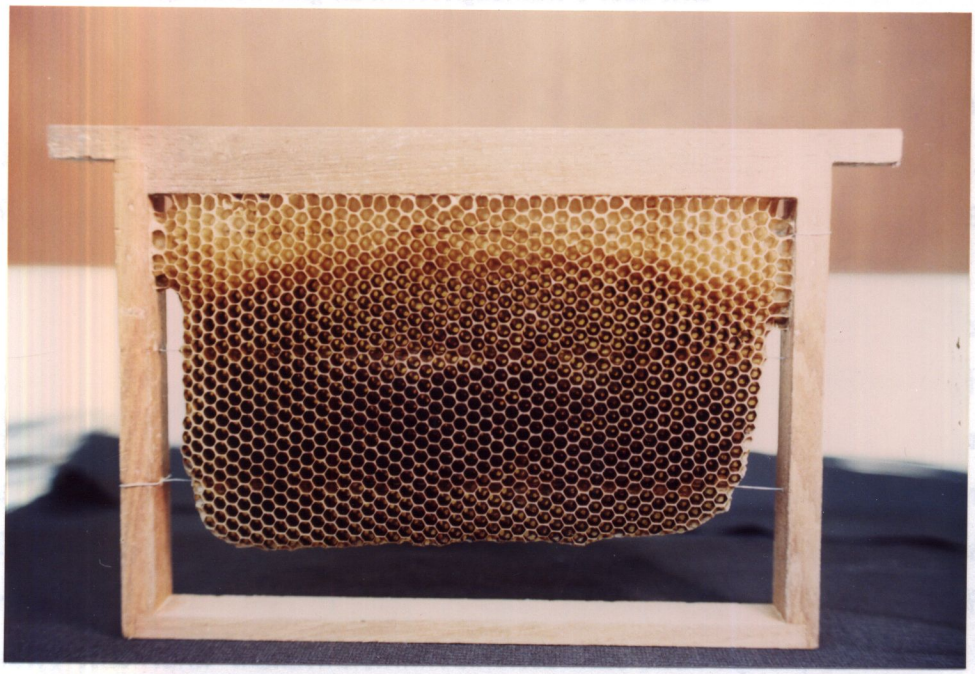


ภาพที่ 2.1 แสดงวงจรชีวิตของผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (USDA, 1970)

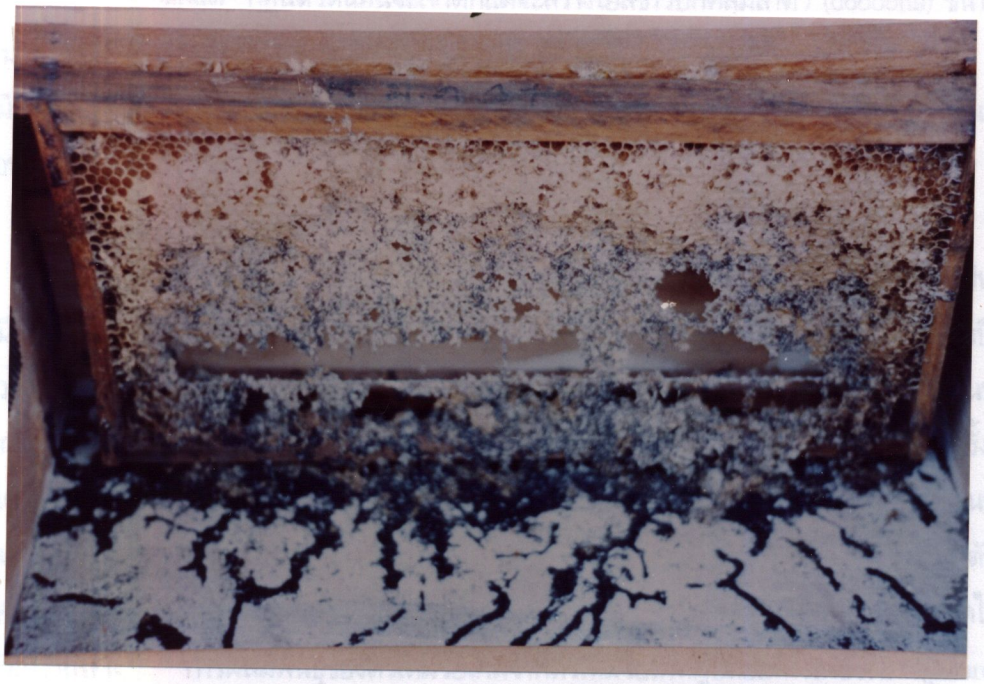
ภาพที่ 2.2 ตัวเต็มวัยของผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* F.



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 พบตามบริเวณฐานรังหรือทึบเลี้ยงขนาดความยาวของดักแด้เรียงชิดกันเป็นกลุ่ม 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

รายงานขั้นแรกเกี่ยวกับการค้นพบเชื้อแบคทีเรีย *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 (ɣ) 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

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.

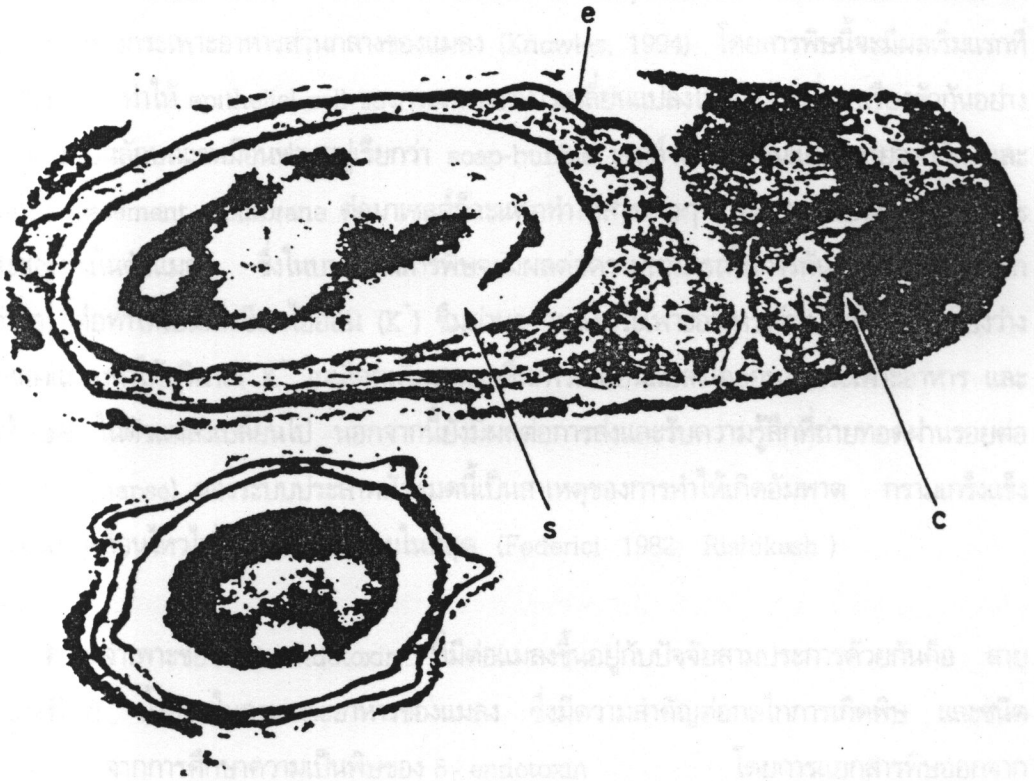
[c] May be designated cryIIIB2.

(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)

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 กรามเกร็งแข็งอ้าปากไม่ได้และเคลื่อนไหวไม่ได้ทำให้แมลงตายในที่สุด (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 rirescens* (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 แม้ว่าเซลล์ชั้นนี้จะลอกหลุดไปพร้อมกับการลอกคราบและแมลงสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาแทน แบคทีเรียที่ออกมาจากเซลล์เก่าที่แตกแล้ว จะเข้าทำลายเซลล์ใหม่ทันทีในเวลาอันรวดเร็ว

แบคทีเรียอาจมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของกระเพาะอาหารของแมลง ทำให้แมลงย่อยอาหารไม่ได้เต็มที่ แมลงอาจตายเพราะการขาดสารอาหารมิใช่จากสารพิษหรือการทวีจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ความผิดปกติอันเนื่องมาจากเอนไซม์ซึ่งแบคทีเรียสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโต 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 และพบว่าสปอร์สามารถคงอยู่ได้ในหีบเลี้ยงผึ้งนานถึง 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. glucucus* 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

บทที่ 3

ตัวอย่าง อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

1. แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 27 สายพันธุ์

1. *Bacillus thuringiensis aizawai*
2. *Bacillus thuringiensis alesti*
3. *Bacillus thuringiensis canadensis*
4. *Bacillus thuringiensis caucasicus*
5. *Bacillus thuringiensis dakota*
6. *Bacillus thuringiensis darmstadiensis*
7. *Bacillus thuringiensis dendrolimus*
8. *Bacillus thuringiensis entomocidus*
9. *Bacillus thuringiensis finitimus*
10. *Bacillus thuringiensis galleriae*
11. *Bacillus thuringiensis isaraelensis* H. 14
12. *Bacillus thuringiensis indiana*
13. *Bacillus thuringiensis kenyae*
14. *Bacillus thuringiensis kumamotoensis*
15. *Bacillus thuringiensis kurstaki*
16. *Bacillus thuringiensis kyushuensis*
17. *Bacillus thuringiensis morrisoni*
18. *Bacillus thuringiensis ostriniae*
19. *Bacillus thuringiensis pakistani*
20. *Bacillus thuringiensis sotto*
21. *Bacillus thuringiensis subtoxicus*
22. *Bacillus thuringiensis thompsoni*

23. *Bacillus thuringiensis thuringiensis* H. 1
24. *Bacillus thuringiensis tochigiensis i*
25. *Bacillus thuringiensis tohokuensis*
26. *Bacillus thuringiensis tolworthi*
27. *Bacillus thuringiensis toumanoffi*

2. แมลงที่ใช้ในการทดลอง

2.1 หนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก (*Achroia grisella* F.)
2.2 หนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella* L.)

3. อาหารสำหรับตัวหนอน

อาหารสำหรับหนอนผีเสื้อทั้ง 2 ชนิด ใช้อาหารเทียมดัดแปลงจากสูตร Haydak's medium (Duxty, 1982; USDA, 1970) ซึ่งประกอบด้วย

1. นมผง
2. glycerol (กลีเซอรอล)
3. น้ำกลั่น
4. น้ำผึ้ง
5. เกสรผึ้ง

4. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมีดังนี้

1. Nutrient agar (NA) ที่ pH 7.8 ซึ่งประกอบด้วย
   - Peptone 10 g
   - Beewax truct 3 g
   - NaCl 5 g
   - Agar 18-20 g
   - Distilled water 1000 ml

2. Tryptic Soy Broth (Difco) สูตรอาหารสำเร็จรูป
3. อาหารสูตร NBSG (Nutrient broth supplement with salt and glucose) ซึ่งประกอบด้วย

- Nutrient broth 40 g
- $CaCl.\ 2H_2O$ 0.4 g
- $MnCl.\ 4H_2O$ 0.25 g
- $ZnSO.\ 7H_2O$ 0.025 g
- $CuSO_4.\ 5H_2O$ 0.025 g
- Glucose 10 g
- Agar 110 g
- Distilled water 5000 ml

5. วัสดุและอุปกรณ์

1. petridish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร และ 2 เซนติเมตร
2. หลอดทดลองขนาด 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร
3. เครื่องกวนสารแท่งแม่เหล็กไฟฟ้า (stirrer)
4. ปิเปตต์
5. บีกเกอร์ขนาด 15, 50, 100, 250 และ 1000 ลูกบาศก์เซนติเมตร
6. กระบอกตวง (measuring cylinder) ขนาด 50 และ 100 ลูกบาศก์มิลลิเมตร
7. เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ (hygrometer)
8. ออกคิวลาร์ ไมโครมิเตอร์ (occular micrometer)
9. เทอร์โมมิเตอร์
10. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
11. ปากคีบสำหรับจับตัวหนอน (forcep)
12. หลอดหยดสาร (dropper)
13. ขวดแม่โขงแบน
14. เครื่องทำแห้ง (lyophilyzer)
15. เครื่อง centrifuge
16. ตู้เย็น
17. เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า

18. ครกบดสาร
19. ตู้อบฆ่าเชื้อ (oven)
20. กล่องพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 และ 10 เซนติเมตร
21. ชั้นวางของ
22. กระดาษวัดค่า pH
23. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereomicroscope - Bausch & Lomb)
24. autoclave
25. foil paper
26. NaCl 0.85%
27. แผ่นรวงรังผึ้ง
28. รอยัลเยลลี่
29. ช้อนตัดสาร
30. ลวดเขี่ยเชื้อ

6. ขั้นตอนการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

โดยได้รับความอนุเคราะห์สายพันธุ์ของแบคทีเรีย *B. thuringiensis* ทั้ง 27 สายพันธุ์ จากกองกีฏวิทยาทางการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

ขั้นตอนที่ 1. การเตรียมเชื้อให้บริสุทธิ์

1. นำเชื้อ *B. thuringiensis* จาก stock culture มาเลี้ยงในอาหาร enrichment media (tryptic soy broth) ที่ pH 7.4-7.6 ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น stock ในครั้งต่อไป
2. เขี่ยเชื้อลงใน agar plate โดยใช้สูตรอาหาร Nutrient agar เลี้ยงใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อต้องการแยกเชื้ออีกครั้งหนึ่ง
3. แยกเชื้อบริสุทธิ์ลงใน nutrient agar slant เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อไป

ขั้นตอนที่ 2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดลอง

1. ถ่ายเชื้อจากขั้นตอนที่ 1 ลงในหลอดแก้วที่มีอาหารสูตร tryptic soy broth เลี้ยงใน incubator อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ถ่ายเชื้อจากหลอดแก้วลงใน media plate ที่อยู่ในขวดแม่โขงแบนโดยใช้สูตรอาหาร NASG เลี้ยงในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 วัน
3. เก็บเชื้อจากขวดแม่โขงโดยใช้ NaCl 0.85 % ละลายเชื้อออกจากขวด
4. นำเชื้อที่ได้ไป centrifuge ที่ 3,000 rmp/min เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แยกส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง
5. นำเชื้อที่แยกได้ไป freeze ที่อุณหภูมิ -77 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. นำเชื้อที่ freeze แล้วไปเข้าเครื่อง lyophilyzer เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำให้เชื้อแห้ง
7. นำเชื้อที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียด เก็บเชื้อไว้ในขวดโดยไม่ให้ความชื้นเข้าได้ เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

7. การเพาะเลี้ยงหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก (*Achroia grisella* F.) และหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (*Galleria Mellonella* L.)

เก็บหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งจากการเข้าทำลายแผ่นรวงรังของผึ้งในธรรมชาติจาก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ สถานีวิจัยชีววิทยาของผึ้ง ต. บางขันแตก อ. เมือง จ. สมุทรสงคราม มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ หน่วยชีววิทยาของผึ้ง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อุณหภูมิห้อง จนหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัย แยกเอาตัวเต็มวัยของผีเสื้อแต่ละชนิดออกมา จับให้ผสมพันธุ์กันโดยการจับเพศผู้และเพศเมียจำนวน 5-8 คู่ มาใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 7 X 9 X 5 เซนต์ติเมตร (กว้างXยาวXสูง) ที่มีกระดาษรองเพื่อเป็นที่วางไข่ จากนั้นแยกเอาไข่มาเลี้ยงในอาหารที่ดัดแปลงจากสูตร Haydak's medium (Daxly et al. 1982; USDA,1970) จนตัวหนอนเข้าสู่ระยะ 3 จึงแยกตัวหนอนออกมาเลี้ยงอาหารใหม่เพื่อไม่ให้ประชากรหนาแน่นเกินไป และเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกครั้งที่เห็นว่าอาหารเริ่มหมดแล้ว โดยใช้อาหารสูตรเดียวตลอดการเจริญเติบโตของตัวหนอน

8. การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ทั้งหมดที่มีพิษสูงต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก (*Achroia grisella F.*)

<u>วิธีการดำเนินการทดสอบในห้องปฏิบัติการ</u> โดยวิธีการผสมลงในอาหารให้หนอนกิน (feeding method) มีขั้นตอนดังนี้

1. แยกตัวหนอนระยะที่ 1-2 ออกมาจากกล่องเลี้ยงเพื่อให้อดอาหาร 2-3 ชั่วโมง
2. ผสม เชื้อ *B. thurigiensis* แต่ละสายพันธุ์ลงในอาหารเทียม โดยใช้ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 % โดยน้ำหนักของเชื้อ *B. thurigiensis* ต่อน้ำหนักของอาหาร ลงใน petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม.
3. นำตัวหนอนที่อดอาหารใส่ลงในอาหาร petri dish ละ 10 ตัวทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ เลี้ยงในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 35 $^{\circ}$C ความชื้น 65-70 %
4. บันทึกผลการตายของตัวหนอนใน 24 และ 48 ชั่วโมง
5. ทำการทดลองจนครบทั้งหมด 27 สายพันธุ์
6. คัดเลือกเชื้อที่มีความเป็นพิษต่อตัวหนอนไปทดสอบประสิทธิภาพในขั้นต่อไป

9. การศึกษาประสิทธิภาพของสายพันธุ์ *Bacillus thurigiensis* ที่มีต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งทั้งสองสายพันธุ์

ก. <u>การผสมเชื้อลงในอาหารเทียม (artificial diet) ให้ตัวหนอนกิน</u>

1. แยกตัวหนอนระยะ 1-2 และ 3-4 ออกจากกล่องเลี้ยงมาอดอาหาร 2-3 ชั่วโมง
2. นำเชื้อที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 8 มาผสมลงในอาหารเทียม ที่ความเข้มข้นต่างๆกันโดยคิดเป็นเปอร์เซนต์น้ำหนักของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ต่อน้ำหนักของอาหาร ใส่ใน pretri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 2 เซนต์ติเมตร
3. นำตัวหนอนจากข้อ1 ใส่ลงใน petri dish ทำการทดลองทั้งหมด 6 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว
4. บันทึกผลการทดลองทุกๆ 24 ชั่วโมง จนถึงตัวเต็มวัย

ข. การผสมเชื้อลงในรวมรังผึ้งให้หนอนกิน

ตัดแผ่นรวงรังขนาด 2 x 2 นิ้ว นำมาจุ่มลงในสารละลายเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ที่มีความเข้มข้น 0.1, 1.0, 5.0, และ 10 g/l เป็นเวลา 1-3 วินาที แล้วนำมาผึ่งให้แห้งจากนั้น ทำการทดลองตามข้อ ก.

10. การทดสอบความเป็นพิษของสายพันธุ์ *Bacillus thurigiensis* ต่อตัวหนอนของผึ้งโพรง *Apis cerana*

1. นำเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ของแต่ละสายพันธุ์มาผสมลงในรอยัลเยลลี่ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใส่ใน petri dish
2. ย้ายตัวหนอนอายุ 3 วันใส่ลงในรอยัลเยลลี่
3. ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว
4. บันทึกผลการทดลองการตายของหนอนผึ้ง 24, 48, และ 72 ชั่วโมง

11. การวิเคราะห์ผล

จากเปอร์เซนต์การตายของกลุ่มทดลองนำมาคำนวนหาเปอร์เซนต์การตายที่แท้จริงโดยใช้สูตร Abbott 's formula (Finney,1971) ซึ่งมีสูตรคือ

$$Pr = \frac{Po - Pc}{100 - Pc} X \quad 100$$

โดยกำหนดให้ Pr = % การตาย ที่แท้จริง

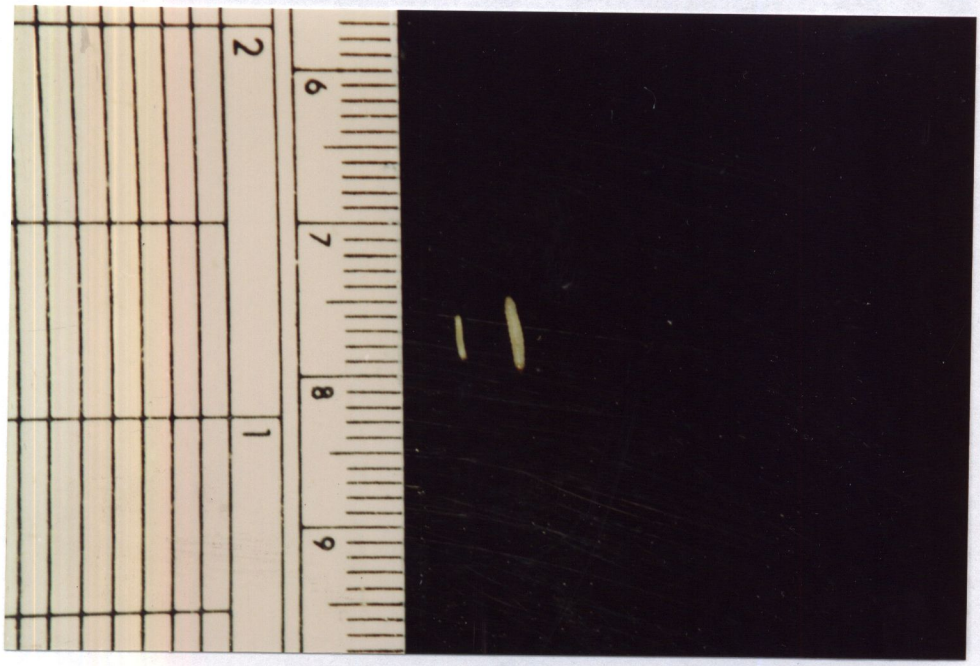
Po = % การตายของกลุ่มทดลอง

Pc = % การตายของกลุ่มควบคุม

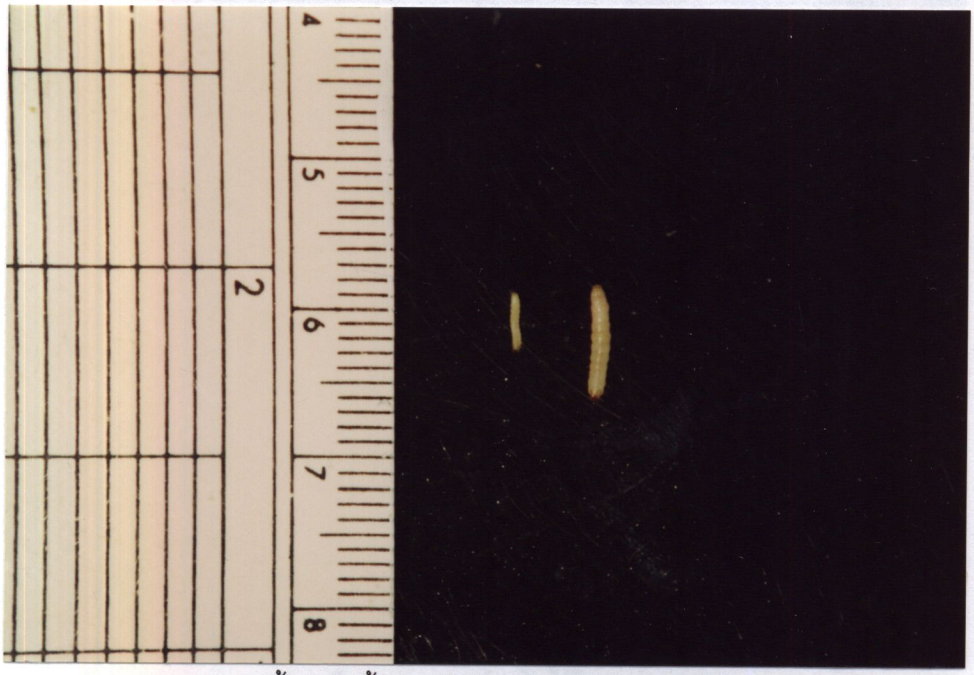
ใช้สูตรนี้เมื่อเปอร์เซนต์การตายในกลุ่มควบคุมน้อยกว่า 20 เปอร์เซนต์ ถ้าสูงกว่า 20 เปอร์เซนต์ จะต้องทำการทดลองใหม่ จากนั้นเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย และเปอร์เซนต์อัตราการตายจริง และใช้วิเคราะห์ข้อมูลทางชีววิทยาเรียกว่า วิธีวิเคราะห์โปรบิท (Probit analysis) ของ Finney (1971) คำนวณหาค่า LC_{50} เปรียบเทียบแต่ละสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* และระยะของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กและหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่

11. การวิเคราะห์ข้อมูล

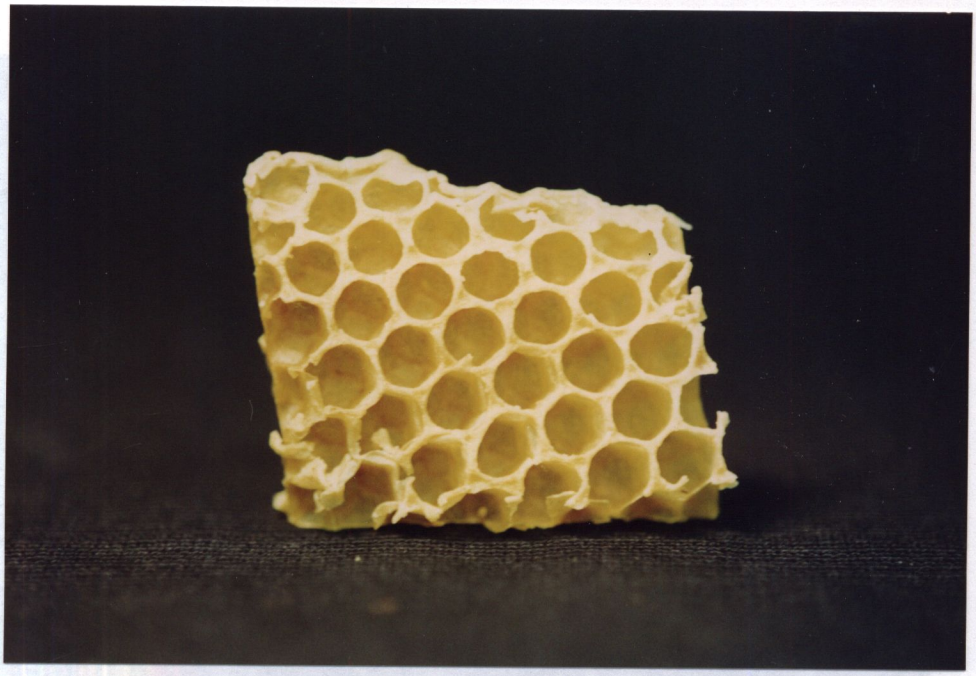
การหาค่า LC_{50} ใช้คอมพิวเตอร์โดยโปรแกรมวิเคราะห์โปรบิทของ Finney (1971) และข้อมูลที่ได้จากการทดลอง นำไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Analysis of variance เพื่อหา F value และ Duncan's new multiple range test (DMRT) สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล ณ. ระดับความเชื่อมั่น 95 %



ภาพ 3.1 หนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* F. ระยะ 1-2 และ 3-4



ภาพ 3.2 หนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* L. ระยะ 1-2 และ 3-4



ภาพที่ 3.3 รวงรังผึ้งที่ใช้ในการทดลอง

ภาพที่ 3.4 อาหารสำหรับใช้ในการทดลอง

ภาพ 3.5 ลักษณะแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ใช้ในการทดลอง

ภาพ 3.6 ลักษณะการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กที่กิน *Bacillus thuringiensis entomocidus*

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การสำรวจหาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆ

การสำรวจหาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆ เพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดผีเสื้อหนอนกินไขผึ้ง จากการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* ทั้งหมด 27 สายพันธุ์ ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* มาจากการเพาะเลี้ยงขึ้นมาเองในรูปผงละลายน้ำ สามารถแยกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ระยะ 1-2 ได้ 3 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.1) คือ

1. *Bacillus thuringiensis dendrolimus*
2. *Bacillus thuringiensis entomocidus*
3. *Bacillus thuringiensis kurstaki*

2. การศึกษาประสิทธิภาพของสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งทั้งสองชนิด

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* แต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ นำมาทดสอบหาระดับความเป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก (*Achroia grisella*) และหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella*) โดยแยกตัวหนอนออกเป็นระยะ 1-2 และ ระยะ 3-4 แสดงในรูปเปอเซนต์การตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 24, 48, 72, และ 168 ชั่วโมง (ปรับด้วย Abbott' s formula) รวมทั้งอัตราการเจริญออกเป็นตัวเต็มวัย พร้อมทั้งค่า LC_{50}, LC_{90} ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.2-4.9 (วิธีการคำนวณใช้โปรแกรม SPSS แสดงในภาพผนวก)

ตารางที่ 4.1 อัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ระยะ 1-2 ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 %

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	เปอร์เซนต์การตาย (%)	
	24 ชม.	48 ชม.
1. *Bacillus thuringiensis isaraelensis* H. 14	0.00	0.00
2. *Bacillus thuringiensis thuringiensis* H. 1	0.00	0.00
3. *Bacillus thuringiensis finitimus*	0.00	0.00
4. *Bacillus thuringiensis alesti*	0.00	0.00
5. *Bacillus thuringiensis kurstaki*	**90.00**	**90.00**
6. *Bacillus thuringiensis sotto*	0.00	0.00
7. *Bacillus thuringiensis dendrolimus*	**100.00**	**100.00**
8. *Bacillus thuringiensis kenyae*	0.00	0.00
9. *Bacillus thuringiensis galleriae*	0.00	0.00
10. *Bacillus thuringiensis canadensis*	0.00	0.00
11. *Bacillus thuringiensis entomocidus*	**70.00**	**80.00**
12. *Bacillus thuringiensis subtoxicus*	0.00	0.00
13. *Bacillus thuringiensis aizawai*	0.00	0.00
14. *Bacillus thuringiensis morrisoni*	0.00	0.00
15. *Bacillus thuringiensis ostriniae*	0.00	0.00
16. *Bacillus thuringiensis tolworthi*	0.00	0.00
17. *Bacillus thuringiensis caucasicus*	0.00	0.00
18. *Bacillus thuringiensis darmstadiensis*	0.00	0.00
19. *Bacillus thuringiensis toumanoffii*	0.00	0.00
20. *Bacillus thuringiensis kyushuensis*	0.00	0.00
21. *Bacillus thuringiensis thompsoni*	0.00	0.00
22. *Bacillus thuringiensis pakistani*	0.00	0.00
23. *Bacillus thuringiensis dakota*	10.00	10.00
24. *Bacillus thuringiensis indiana*	0.00	0.00
25. *Bacillus thuringiensis tohokuensis*	0.00	0.00
26. *Bacillus thuringiensis kumamotoensis*	0.00	0.00
27. *Bacillus thuringiensis tochigiensis*	10.00	10.00

2.1 การทดสอบความเป็นพิษ *Bacillus thuringiensis* ในอาหารเทียม

2.1.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก (ตารางที่ 4.2-4.3) ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis kurstaki* เท่ากับ 0.44, 0.34 และ 0.30 % (w/w) ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis entomocidus* เท่ากับ 1.15, 0.45 และ 0.36 % (w/w) และ ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* เท่ากับ 0.74, 0.25 และ 0.0.22 % (w/w) ที่ระยะเวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง สำหรับหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ 1-2 และค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis kurstaki* เท่ากับ 9.91, 1.64 และ 1.26 % (w/w) ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis entomocidus* เท่ากับ 1.23, 0.65 และ 0.50 % (w/w) ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* เท่ากับ 2.22, 0.51 และ 0.24 % (w/w) ที่ระยะเวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง สำหรับหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ 3-4

จากการสังเกตการเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ1-2 พบว่าที่การทดสอบความเป็นพิษที่ความเข้มข้น 0.4, 0.3 และ 0.3 % ของ *Bacillus thuringiensis kurstaki*, *Bacillus thuringiensis entomocidus* และ *Bacillus thuringiensis dendrolomus* นั้นปรากฏว่าไม่พบหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัย และการเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ 3-4 พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.75 % จะไม่พบหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัยทั้ง 3 สายพันธุ์ และการเจริญเป็นตัวเต็มวัยของหนอนระยะ 3-4 พบว่า *Bacillus thuringiensis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่พบหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัยที่ความเข้มข้น 0.75 % (W/W)

ตารางที่ 4.2 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ระยะที่ 1-2 ในอาหารเทียม

ความเข้มข้น (%)	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การตาย				% เจริญเป็นตัวเต็มวัย
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม	168 ชม.	
B.t.d.					
0.0 (control)	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
0.1	1.67	3.33	6.67	40.00	50.00
0.2	15.00	25.00	28.3	65.00	30.00
0.3	38.33	41.40	53.33	70.00	10.00
0.4	40.00	56.67	60.00	85.00	0.00
0.5	55.00	70.00	73.33	95.00	0.00
LC_{50}	0.44	0.34	0.30	*	-
LC_{90}	1.20	0.89	0.83	*	-
B.t.d.					
0.0 (control)	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
0.1	5.00	18.33	20.00	45.00	40.00
0.2	13.33	50.00	53.33	55.00	25.00
0.3	23.33	55.00	60.00	65.00	0.00
0.4	26.67	63.33	68.33	80.00	0.00
0.5	40.00	68.33	75.00	80.50	0.00
LC_{50}	0.74	0.25	0.22	*	-
LC_{50}	3.39	1.24	0.94	*	-
B.t.e.					
0.0 (control)	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
0.1	10.00	13.33	16.67	40.00	50.00
0.2	18.33	20.00	21.67	55.00	30.00
0.3	23.33	40.00	45.00	65.00	0.00
0.4	26.67	46.67	50.00	65.00	0.00
0.5	35.00	53.33	66.67	75.00	0.00
LC_{50}	1.15	0.45	0.36	*	-
LC_{50}	13.15	2.23	1.53	*	-

* ไม่สามารถคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} ได้

ตารางที่ 4.3 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ระยะที่ 3 - 4 ในอาหารเทียม

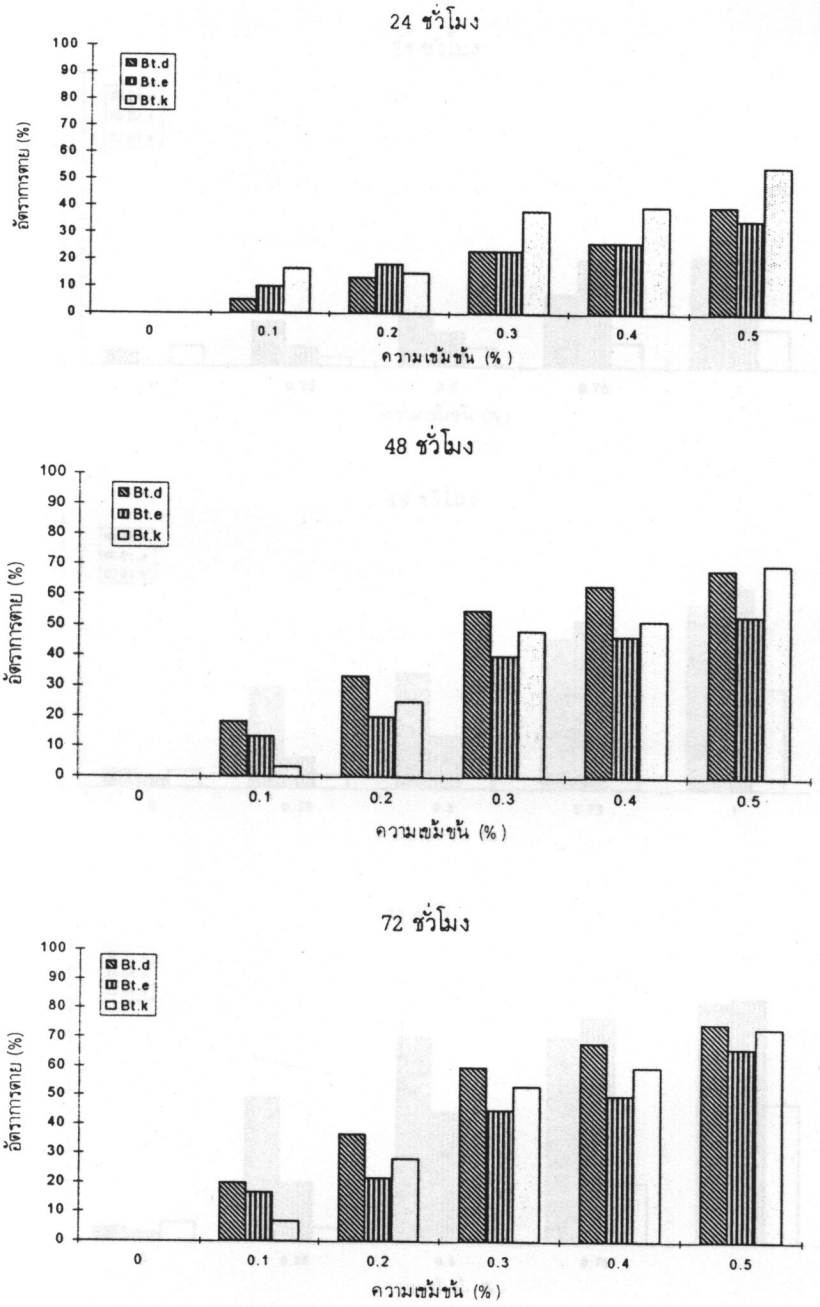
ความเข้มข้น (%)	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การตา (%)				เจริญเป็นตัวเต็มวัย
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	168 ชม.	
B.t.k.					
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	96.67
0.25	0.00	1.72	1.72	7.41	65.00
0.50	3.46	8.63	8.63	20.35	53.33
0.75	5.17	12.07	1724	77.94	0.00
1.00	10.34	20.35	44.83	94.83	0.00
LC_{50}	9.91	1.64	1.26	*	-
LC_{90}	125.29	6.19	3.79	*	-
B.t.e.					
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	96.67
0.25	6.67	8.63	17.24	37.93	36.67
0.50	11.67	17.24	41.38	74.14	6.67
0.75	36.67	63.79	74.14	98.62	0.00
1.00	40.00	75.87	81.04	100	0.00
LC_{50}	1.23	0.65	0.50	*	-
LC_{90}	4.30	1.40	1.31	*	-
B.t.d.					
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	93.33
0.25	13.67	33.92	46.43	51.18	34.67
0.50	16.94	37.50	66.07	80.00	11.67
0.75	23.73	53.57	66.07	83.93	0.00
1.00	37.28	67.85	78.57	100	0.00
LC_{50}	2.22	0.51	0.24	*	-
LC_{90}	35.70	4.91	2.57	*	-

* ไม่สามารถคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} ได้

การเปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กต่อสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* (ภาพที่ 4.1-4.2)

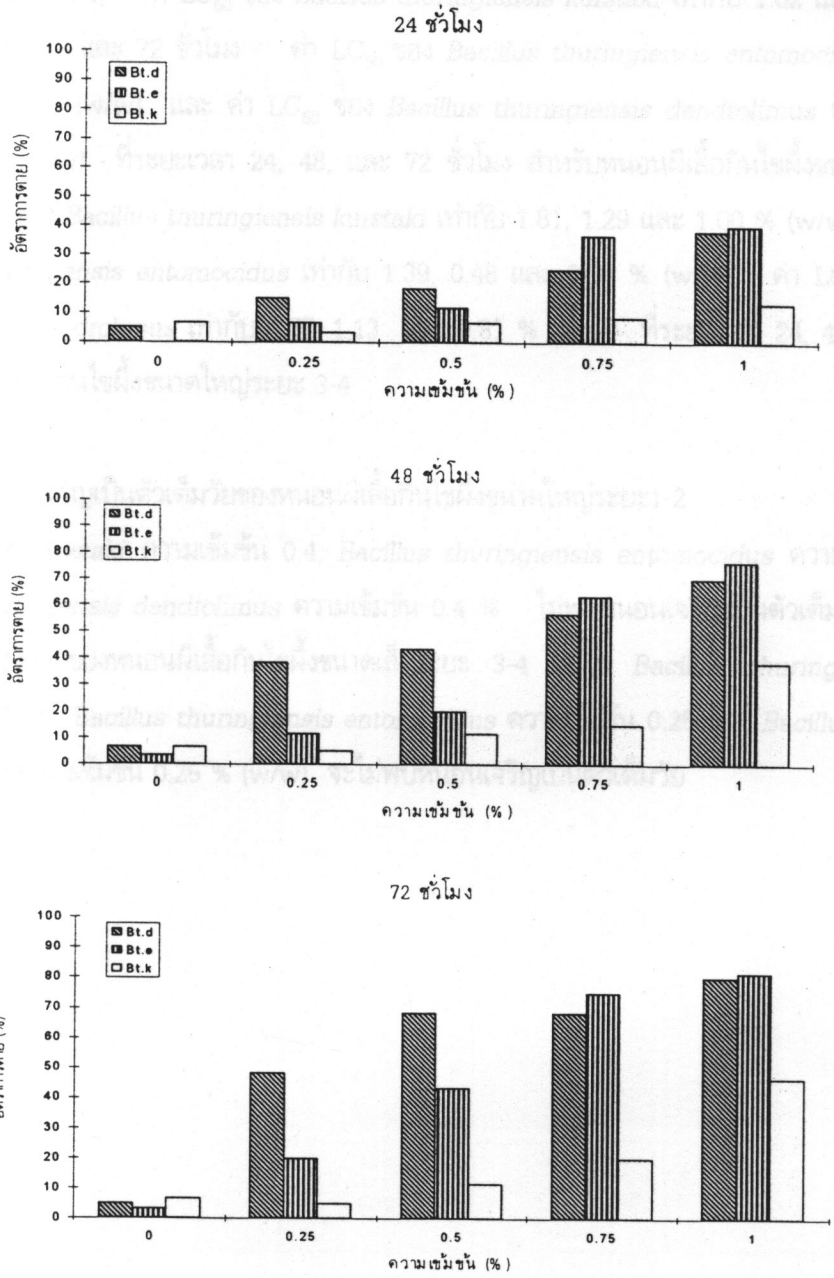
1. เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ1-2 (ภาพที่ 4.1) พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.5 % ระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และ *Bacillus thuringiensis kurstaki* มีอัตราการตายสูงกว่า *Bacillus thuringiensis entomocidus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ *Bacillus thuringiensis kurstaki* ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง จะไม่พบอัตราการตายที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

2. เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ 3-4 (ภาพที่ 4.2) พบว่าที่ความเข้มข้น 1.0 % ระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และ *Bacillus thuringiensis entomocidus* มีอัตราการตายสูงกว่า *Bacillus thuringiensis kurstaki* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และ *Bacillus thuringiensis entomocidus* ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 1.0 % ไม่พบอัตราการตายที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$)



ภาพที่ 4.1 เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ระยะ 1-2 ในอาหารเทียมของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

(อักษรเหมือนกันในกลุ่มเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ระยะ 3-4 ในอาหารเทียมของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

(อักษรเหมือนกันในกลุ่มเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$)

2.1.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (ตารางที่ 4.4-4.5) ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis kurstaki* เท่ากับ 1.02 และ 0.71 % (w/w) ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis entomocidus* เท่ากับ 0.45, 0.17 และ 0.06 % (w/w) และ ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* เท่ากับ 0.92, 0.76 และ 0.43 % (w/w) ที่ระยะเวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง สำหรับหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ระยะ 1-2 และค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis kurstaki* เท่ากับ 1.81, 1.29 และ 1.00 % (w/w) ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis entomocidus* เท่ากับ 1.39, 0.48 และ 0.28 % (w/w) ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* เท่ากับ 1.77, 1.13 และ 0.81 % (w/w) ที่ระยะเวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง สำหรับหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ระยะ 3-4

การเจริญเป็นตัวเต็มวัยของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ระยะ1-2 พบว่า *Bacillus thuringiensis kurstaki* ความเข้มข้น 0.4, *Bacillus thuringiensis entomocidus* ความเข้มข้น 0.1 และ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* ความเข้มข้น 0.4 % ไม่พบหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัย และการเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ 3-4 พบว่า *Bacillus thuringiensis kurstaki* ความเข้มข้น 0.50, *Bacillus thuringiensis entomocidus* ความเข้มข้น 0.25 และ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* ความเข้มข้น 0.25 % (w/w) จะไม่พบหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัย

ตารางที่ 4.4 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะที่ 1-2 ในอาหารเทียม

ความเข้มข้น (%)	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การตาย				% เจริญเป็นตัวเต็มวัย
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	168 ชม.	
B.t.k.					
0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
0.1	0.00	5.00	6.67	6.67	90.00
0.2	1.67	6.67	13.33	65.00	25.00
0.3	3.33	13.33	21.67	65.00	10.00
0.4	6.67	15.00	26.67	70.00	0.00
0.5	16.67	33.33	45.00	80.00	0.00
LC_{50}	*	1.02	0.71	*	-
LC_{90}	*	4.90	3.26	*	-
B.t.e.					
0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
0.1	3.33	28.33	68.33	100.00	0.00
0.2	16.67	53.33	88.33	100.00	0.00
0.3	41.67	78.33	93.33	100.00	0.00
0.4	43.33	83.33	95.00	100.00	0.00
0.5	50.00	86.67	100.00	100.00	0.00
LC_{50}	0.45	0.17	0.06	*	-
LC_{90}	1.42	0.54	0.22	*	-
B.t.d.					
0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
0.1	0.00	1.67	10.00	10.00	90.00
0.2	6.67	18.33	25.00	50.00	45.00
0.3	11.67	28.33	41.67	75.00	20.00
0.4	20.00	30.00	45.00	95.00	0.00
0.5	23.33	33.33	55.00	95.00	0.00
LC_{50}	0.92	0.76	0.43	*	-
LC_{90}	3.06	4.04	1.90	*	-

* ไม่สามารถคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} ได้

ตารางที่ 4.5 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะที่ 3 - 4 ในอาหารเทียม

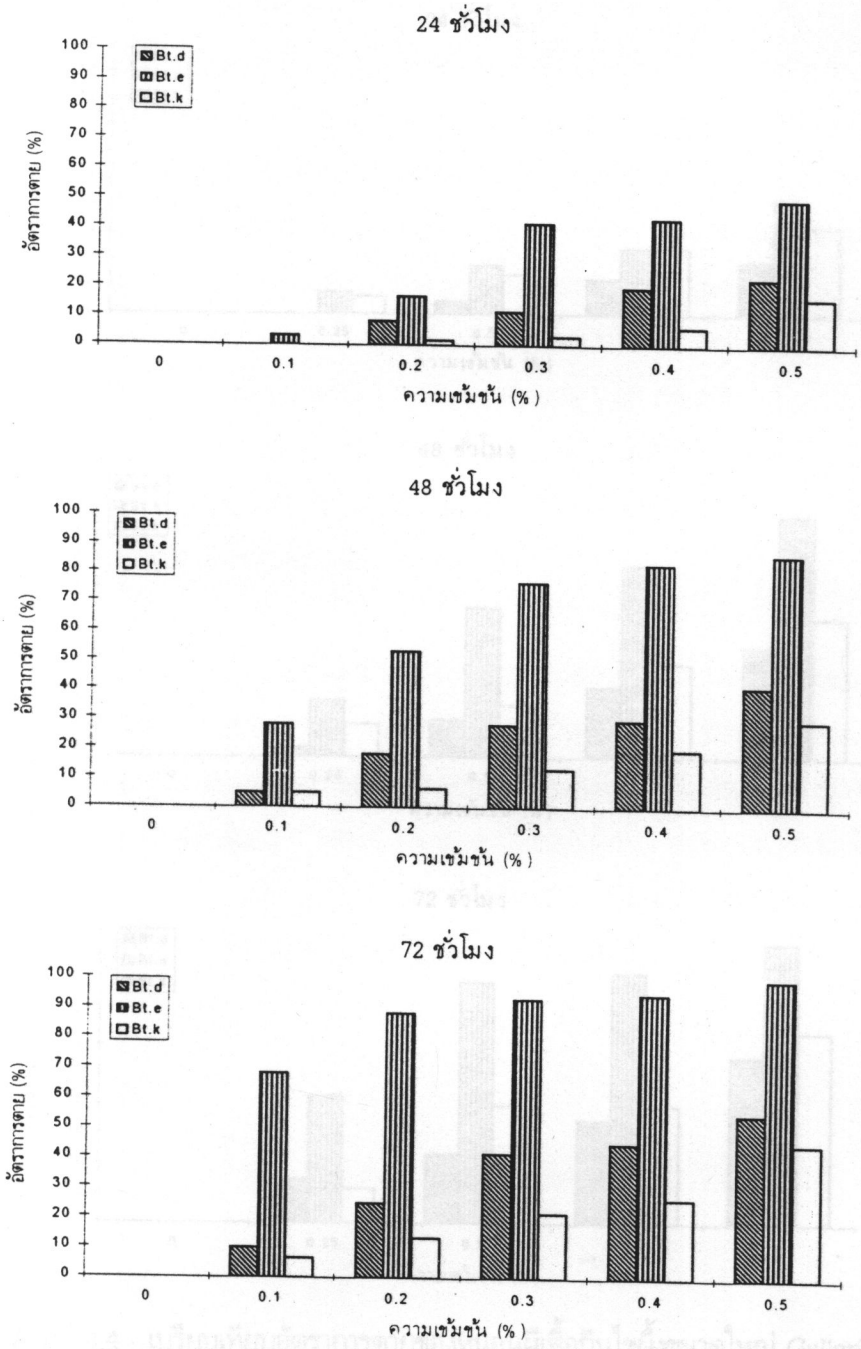
ความเข้มข้น (%)	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การตาย				% เจริญเป็นตัวเต็มวัย
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	168 ชม.	
B.t.k.					
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
0.25	0.00	3.33	5.00	26.67	60.00
0.50	5.00	13.33	23.33	35.00	0.00
0.75	13.33	25.00	35.00	56.67	0.00
1.00	20.00	40.00	56.67	76.67	0.00
LC_{50}	1.81	1.29	1.00	*	-
LC_{90}	4.72	3.93	3.09	*	-
B.t.e.					
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
0.25	8.33	20.00	43.33	86.67	0.00
0.50	18.33	53.33	81.67	100.00	0.00
0.75	25.00	68.33	85.00	100.00	0.00
1.00	43.33	86.67	95.00	100.00	0.00
LC_{50}	1.39	0.48	0.28	*	-
LC_{90}	6.26	1.25	0.79	*	-
B.t.d.					
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
0.25	6.67	11.67	11.67	80.00	0.00
0.50	15.00	18.33	28.33	90.00	0.00
0.75	25.00	33.33	40.00	93.33	0.00
1.00	33.33	50.00	65.00	100	0.00
LC_{50}	1.77	1.13	0.81	*	-
LC_{90}	9.01	4.88	2.62	*	-

* ไม่สามารถคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} ได้

การเปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กต่อสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* (ภาพที่ 4.3-4.4)

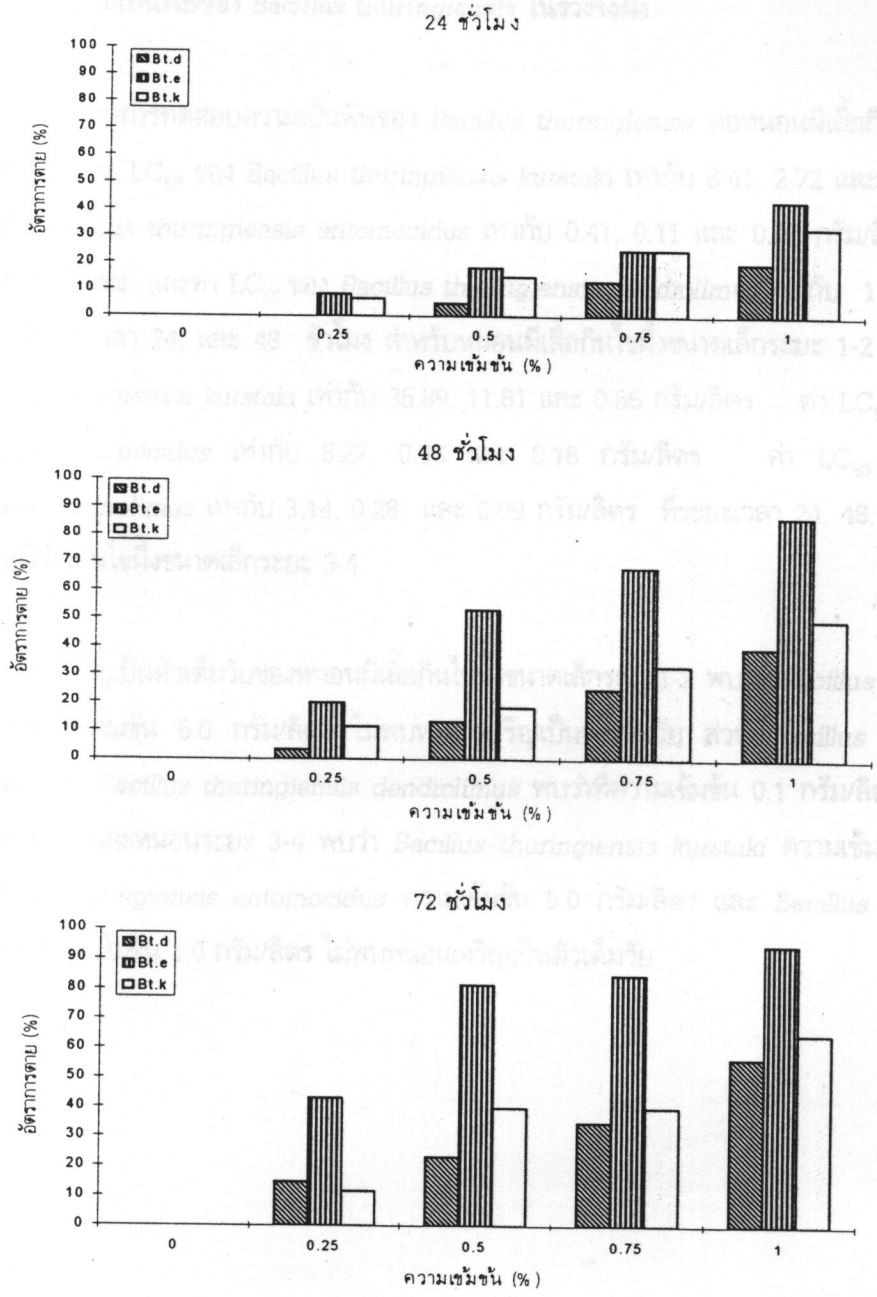
1. เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ระยะ1-2 (ภาพที่ 4.3) พบว่าที่ความเข้มข้น *Bacillus thuringiensis entomocidus* มีอัตราการตายสูงกว่า *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และ *Bacillus thuringiensis kurstaki* อย่างมีนัยสำคัญที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยที่ความเข้มข้น 0.3, 0.4 และ 0.5 % ระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่พบอัตราการตายที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

2. เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ระยะ 3-4 (ภาพที่ 4.4) พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.50, 0.75 และ 1.00 % *Bacillus thuringiensis entomocidus* มีอัตราการตายสูงกว่า *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และ *Bacillus thuringiensis kurstaki* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ในระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.3 เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะ 1-2 ในอาหารเทียมของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

(อักษรเหมือนกันในกลุ่มเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.4 เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะ 3-4 ในอาหารเทียมของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

(อักษรเหมือนกันในกลุ่มเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$)

2.2 การทดสอบความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ในรวงรังผึ้ง

2.2.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก (ตารางที่ 4.6-4.7) ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis kurstaki* เท่ากับ 8.41, 2.72 และ 0.50 กรัม/ลิตร ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis entomocidus* เท่ากับ 0.41, 0.11 และ 0.06 กรัม/ลิตร ที่ระยะเวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง และค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* เท่ากับ 1.14 และ 0.004 กรัม/ลิตร ที่ระยะเวลา 24, และ 48 ชั่วโมง สำหรับหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ 1-2 และค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis kurstaki* เท่ากับ 35.89, 11.81 และ 0.85 กรัม/ลิตร ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis entomocidus* เท่ากับ 8.27, 0.86 และ 0.18 กรัม/ลิตร ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* เท่ากับ 3.14, 0.28 และ 0.09 กรัม/ลิตร ที่ระยะเวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง สำหรับหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ 3-4

การเจริญเป็นตัวเต็มวัยของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ1-2 พบว่า *Bacillus thuringiensis kurstaki* ที่ความเข้มข้น 5.0 กรัม/ลิตร ไม่พบหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัย ส่วน *Bacillus thuringiensis entomocidus* และ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* พบว่าที่ความเข้มข้น 0.1 กรัม/ลิตร ไม่พบหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัย และหนอนระยะ 3-4 พบว่า *Bacillus thuringiensis kurstaki* ความเข้มข้น 10.0 กรัม/ลิตร *Bacillus thuringiensis entomocidus* ความเข้มข้น 5.0 กรัม/ลิตร และ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* ความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร ไม่พบหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัย

ตารางที่ 4.6 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ระยะที่ 1-2 ในรวงรังผึ้ง

ความเข้มข้น (g/l)	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การตาย				% เจริญเป็นตัวเต็มวัย
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	168 ชม.	
B.t.k.					
0.00 (control)	0.00	0.00	0.00	6.67	80.00
0.10	5.26	40.35	54.39	67.86	20.00
1.00	17.55	42.11	70.18	82.14	10.00
5.00	43.86	49.13	78.95	89.29	0.00
10.00	49.13	63.16	85.97	96.43	0.00
LC_{50}	8.41	2.72	0.05	*	-
LC_{90}	545.86	311.96	36.02	*	-
B.t.e.					
0.00 (control)	0.00	0.00	0.00	0.00	80.00
0.10	28.07	46.44	51.78	69.81	0.00
1.00	61.40	69.65	83.93	81.13	0.00
5.00	77.19	85.72	91.07	96.23	0.00
10.00	82.45	91.07	96.43	100.00	0.00
LC_{50}	0.41	0.11	0.06	*	-
LC_{90}	23.99	8.85	2.57	*	-
B.t.d					
0.00 (control)	0.00	0.00	0.00	0.00	80.00
0.10	7.02	70.18	80.70	88.33	0.00
1.00	52.63	73.68	85.97	91.67	0.00
5.00	68.42	75.44	91.23	96.67	0.00
10.00	82.45	96.49	100.00	100.00	0.00
LC_{50}	1.14	0.004	*	*	-
LC_{90}	20.81	23.49	*	*	-

*. ไม่สามารถคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} ได้

ตารางที่ 4.7 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ระยะที่ 3-4 ในรวงรังผึ้ง

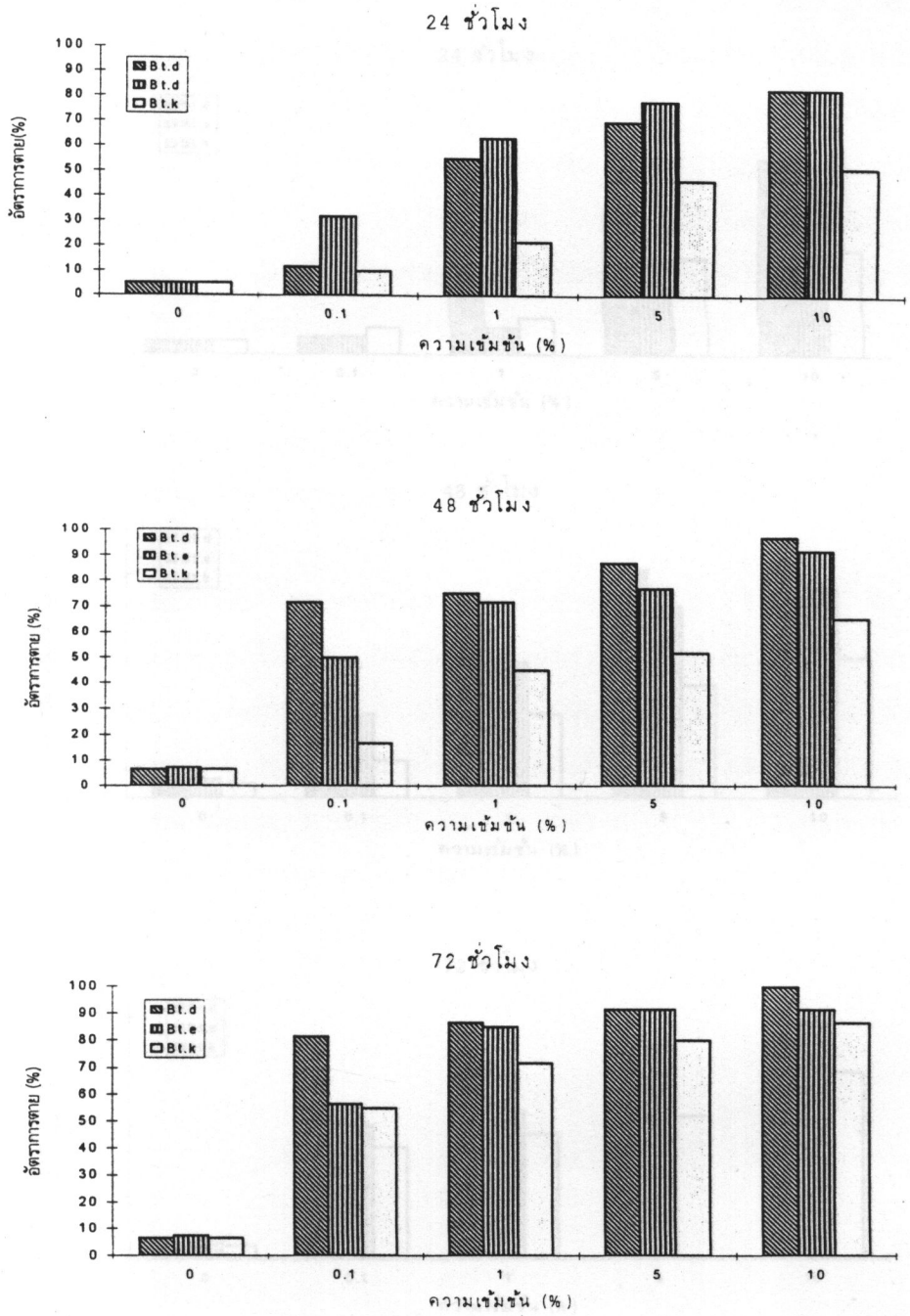
ความเข้มข้น (g/l)	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การตาย				% เจริญเป็นตัวเต็มวัย
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	168 ชม.	
B.t.k.					
0.00 (control)	0.00	0.00	0.00	0.00	80.00
0.10	5.26	8.77	38.60	46.43	50.00
1.00	8.77	26.32	43.86	51.78	50.00
5.00	31.58	36.84	50.87	64.23	40.00
10.00	35.08	47.37	68.42	82.14	0.00
LC_{50}	35.89	11.51	0.85	*	-
LC_{90}	7264.28	2952.88	12424.12	*	-
B.t.e.					
0.00 (control)	0.00	0.00	0.00	0.00	80.00
0.10	1.76	25.00	46.43	57.14	30.00
1.00	5.26	44.64	51.78	60.07	30.00
5.00	31.58	66.07	78.57	80.04	0.00
10.00	61.40	73.32	82.14	91.07	0.00
LC_{50}	8.27	0.86	0.18	*	-
LC_{90}	163.46	114.04	33.39	*	-
B.t.d.					
0.00 (control)	0.00	0.00	0.00	0.00	80.00
0.10	1.76	31.58	49.13	57.14	10.00
1.00	29.82	68.42	75.44	82.14	0.00
5.00	50.87	80.71	91.23	92.85	0.00
10.00	70.18	84.21	92.98	94.64	0.00
LC_{50}	3.14	0.28	0.09	*	-
LC_{90}	62.71	16.58	4.66	*	-

* ไม่สามารถคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} ได้

เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กในรวงรังผึ้งต่อสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* (ภาพที่ 4.5-4.6)

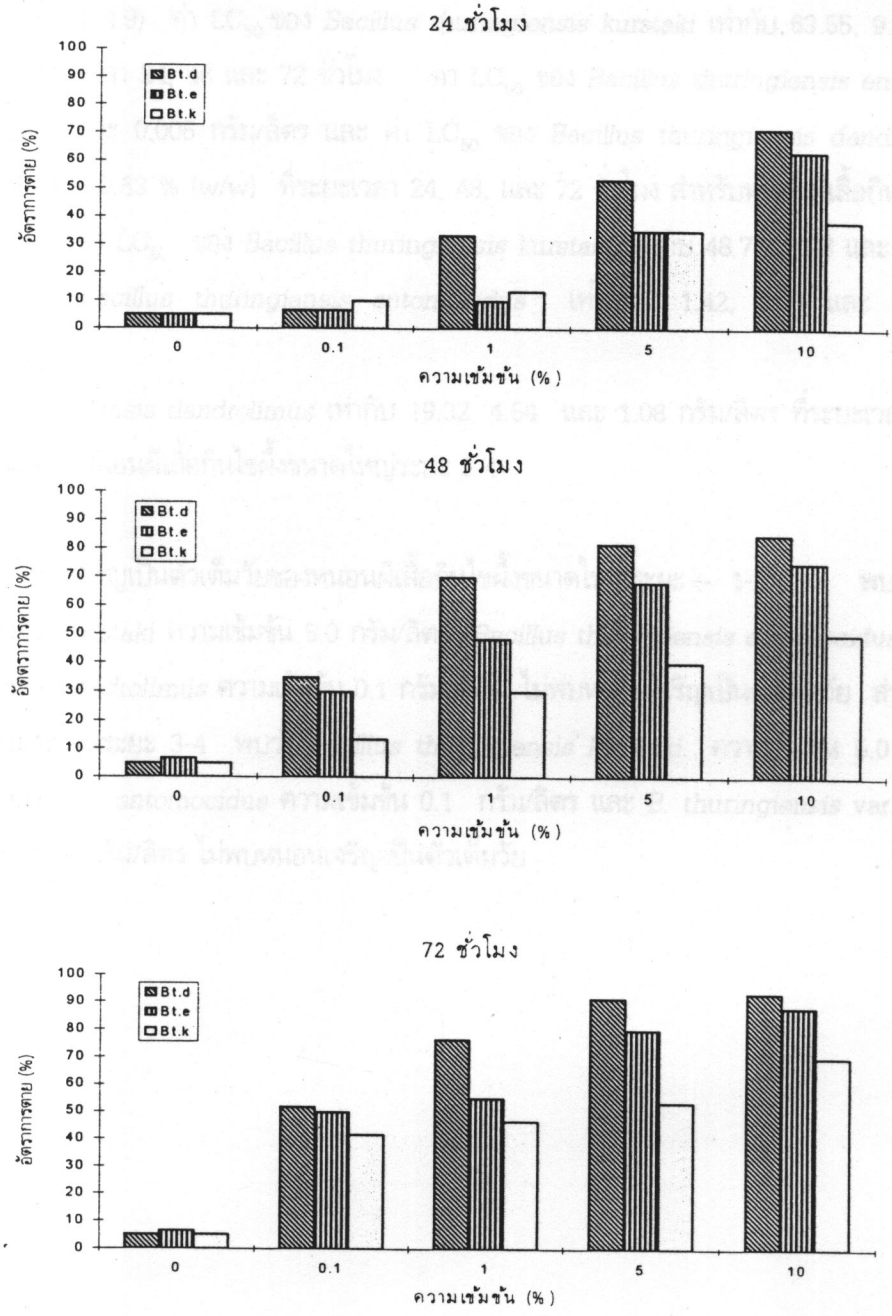
1. เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ 1-2 พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 5.0 และ 10.0 กรัม/ลิตร *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และ *Bacillus thuringiensis entomocidus* มีอัตราการตายของหนอนสูงกว่า *Bacillus thuringiensis kurstaki* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยที่ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และ *Bacillus thuringiensis entomocidus* มีอัตราการตายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กระยะ 3-4 พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10.0 กรัม/ลิตร *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และ *Bacillus thuringiensis entomocidus* อัตราการตายไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีอัตราการตายของหนอนสูงกว่า *Bacillus thuringiensis kurstaki* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่ 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.5 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ระยะ 1-2 ในรวงรังผึ้งของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

(อักษรเหมือนกันในกลุ่มเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.6 เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ระยะ 3-4 ในรวงรังผึ้งของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

(อักษรเหมือนกันในกลุ่มเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$)

2.2.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (ตารางที่ 4.8-4.9) ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis kurstaki* เท่ากับ 63.55, 9.20 และ 1.29 กรัม/ลิตร ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis entomocidus* เท่ากับ 0.51, 0.07 และ 0.006 กรัม/ลิตร และ ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* เท่ากับ 16.13, 3.96 และ 0.63 % (w/w) ที่ระยะเวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง สำหรับหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ระยะ 1-2 และค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis kurstaki* เท่ากับ 48.74, 5.38 และ 1.62 กรัม/ลิตร ค่า LC_{50} ของ *Bacillus thuringiensis entomocidus* เท่ากับ 1.42, 0.18 และ 0.08 กรัม/ลิตร ค่า LC_{50} ของ

Bacillus thuringiensis dendrolimus เท่ากับ 19.32, 4.54 และ 1.08 กรัม/ลิตร ที่ระยะเวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง สำหรับหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ระยะ 3-4

การเจริญเป็นตัวเต็มวัยของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ระยะ 1-2 พบว่า *Bacillus thuringiensis kurstaki* ความเข้มข้น 5.0 กรัม/ลิตร *Bacillus thuringiensis entomocidus* และ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* ความเข้มข้น 0.1 กรัม/ลิตร ไม่พบหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัย ส่วนการเจริญเป็นตัวเต็มวัยของหนอนระยะ 3-4 พบว่า *Bacillus thuringiensis kurstaki* ความเข้มข้น 5.0 กรัม/ลิตร *B. thuringiensis* var. *entomocidus* ความเข้มข้น 0.1 กรัม/ลิตร และ *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* ความเข้มข้น 10.0 กรัม/ลิตร ไม่พบหนอนเจริญเป็นตัวเต็มวัย

ตารางที่ 4.8 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะที่ 1-2 ในรวงรังผึ้ง

ความเข้มข้น (g/l)	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การตาย				% เจริญเป็นตัวเต็มวัย
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	168 ชม.	
B.t.k.					
0.00	0.00	0.00	0.00	8.33	80.00
0.10	1.69	6.90	21.05	25.46	50.00
1.00	5.08	27.59	45.61	63.64	20.00
5.00	16.94	43.11	57.89	78.18	0.00
10.00	30.51	46.55	71.93	85.45	0.00
LC_{50}	63.55	9.20	1.29	*	-
LC_{90}	3565.97	1092.54	165.09	*	-
B.t.e.					
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	80.00
0.10	32.20	51.72	84.21	100.00	0.00
1.00	50.85	79.31	92.98	100.00	0.00
5.00	79.66	91.38	100.00	100.00	0.00
10.00	81.36	93.10	100.00	100.00	0.00
LC_{50}	0.51	0.07	0.006	*	-
LC_{90}	32.65	4.17	0.24	*	-
B.t.d.					
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	80.00
0.10	3.39	6.90	24.56	27.27	0.00
1.00	10.17	41.38	58.24	58.19	0.00
5.00	35.59	48.28	70.18	87.27	0.00
10.00	42.37	56.89	77.19	90.10	0.00
LC_{50}	16.13	3.98	0.63	*	-
LC_{90}	592.83	299.82	51.80	*	-

* ไม่สามารถคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} ได้

ตารางที่ 4.9 แสดงความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะที่ 3-4 ในรวงรังผึ้ง

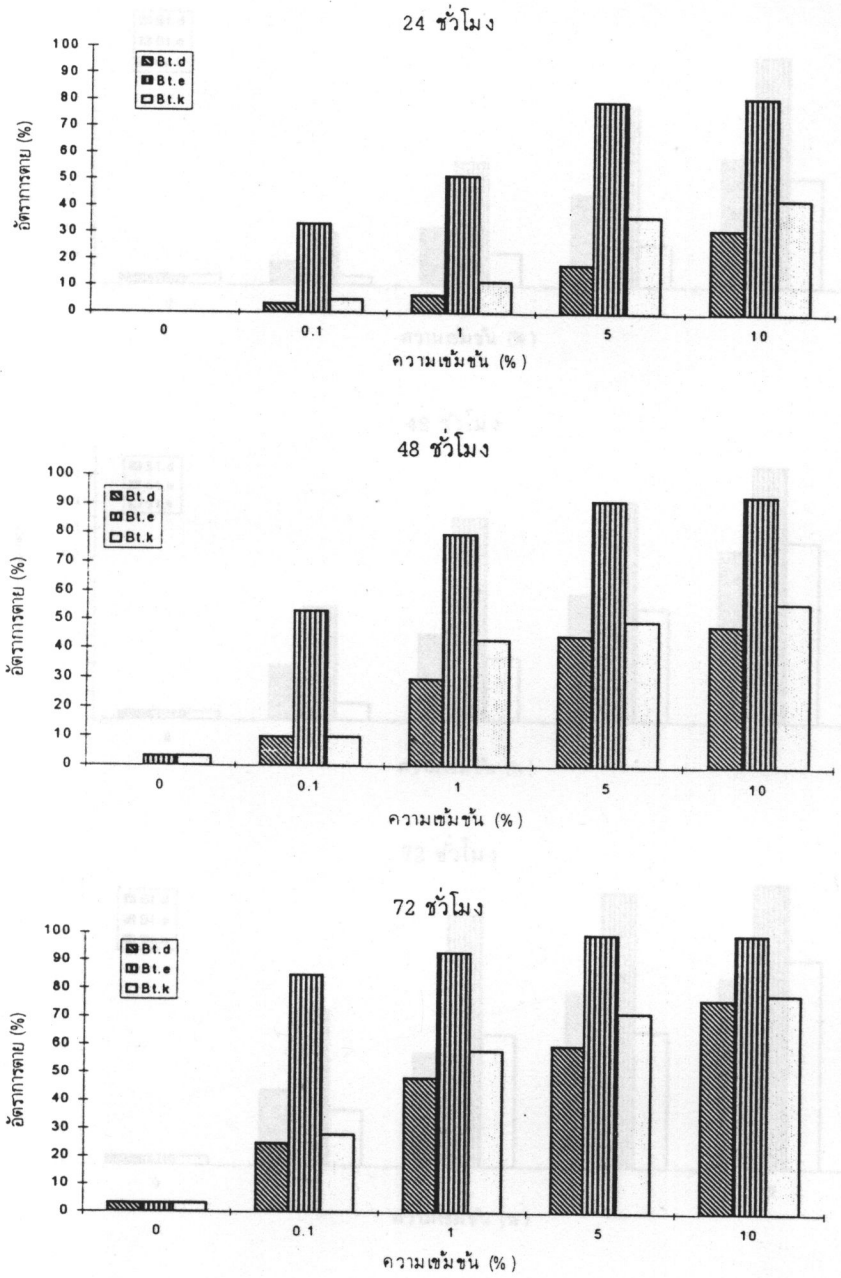
ความเข้มข้น (g/l)	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การตาย				% เจริญเป็นตัวเต็มวัย
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	168 ชม.	
B.t.k.					
0.00 (control)	0.00	0.00	3.33	8.33	90.00
0.10	3.33	3.46	17.24	40.00	30.00
1.00	11.67	20.69	44.83	50.00	20.00
5.00	15.00	39.66	46.55	61.67	0.00
10.00	38.33	65.52	73.33	93.33	0.00
LC_{50}	48.74	5.38	1.62	*	-
LC_{90}	2894.54	127.16	121.80	*	-
B.t.e.					
0.00 (control)	0.00	0.00	0.00	0.00	90.00
0.10	18.33	39.66	53.34	89.09	0.00
1.00	43.33	74.14	87.93	100.00	0.00
5.00	63.33	86.21	96.56	100.00	0.00
10.00	80.00	94.83	100.00	100.00	0.00
LC_{50}	1.42	0.18	0.08	*	-
LC_{90}	50.25	7.49	1.03	*	-
B.t.d.					
0.00 (control)	0.00	3.33	3.33	8.33	90.00
0.10	6.67	15.52	34.49	27.27	60.00
1.00	20.00	29.32	55.18	43.63	50.00
5.00	31.67	44.83	60.35	67.63	20.00
10.00	45.00	62.07	65.53	70.90	0.00
LC_{50}	19.32	4.54	1.08	*	-
LC_{90}	1641.67	660.76	355.66	*	-

* ไม่สามารถคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} ได้

การเปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ต่อสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* (ภาพที่ 4.7-4.8)

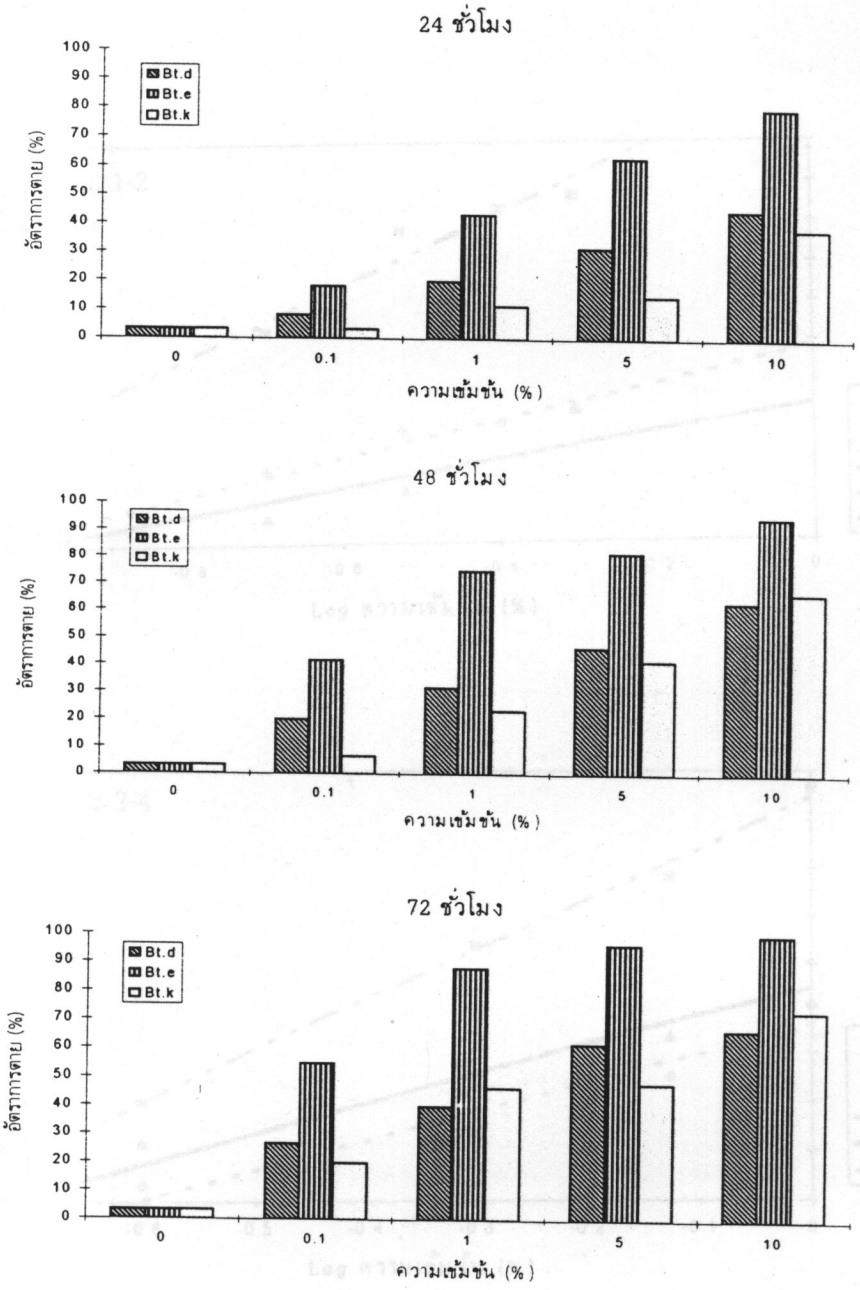
1. เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ระยะ1-2 (ภาพที่ 4.7) พบว่าที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0, 5.0 และ 10.0 % *Bacillus thuringiensis entomocidus* มีอัตราการตายสูงกว่า *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และ *Bacillus thuringiensis kurstaki* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยที่ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และ *Bacillus thuringiensis kurstaki* มีอัตราการตายที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

2. เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ระยะ 3-4 (ภาพที่ 4.8) พบว่าที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0, 5.0 และ 10.0 % *Bacillus thuringiensis entomocidus* มีอัตราการตายสูงกว่า *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และ *Bacillus thuringiensis kurstaki* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยที่ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และ *Bacillus thuringiensis kurstaki* มีอัตราการตายที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



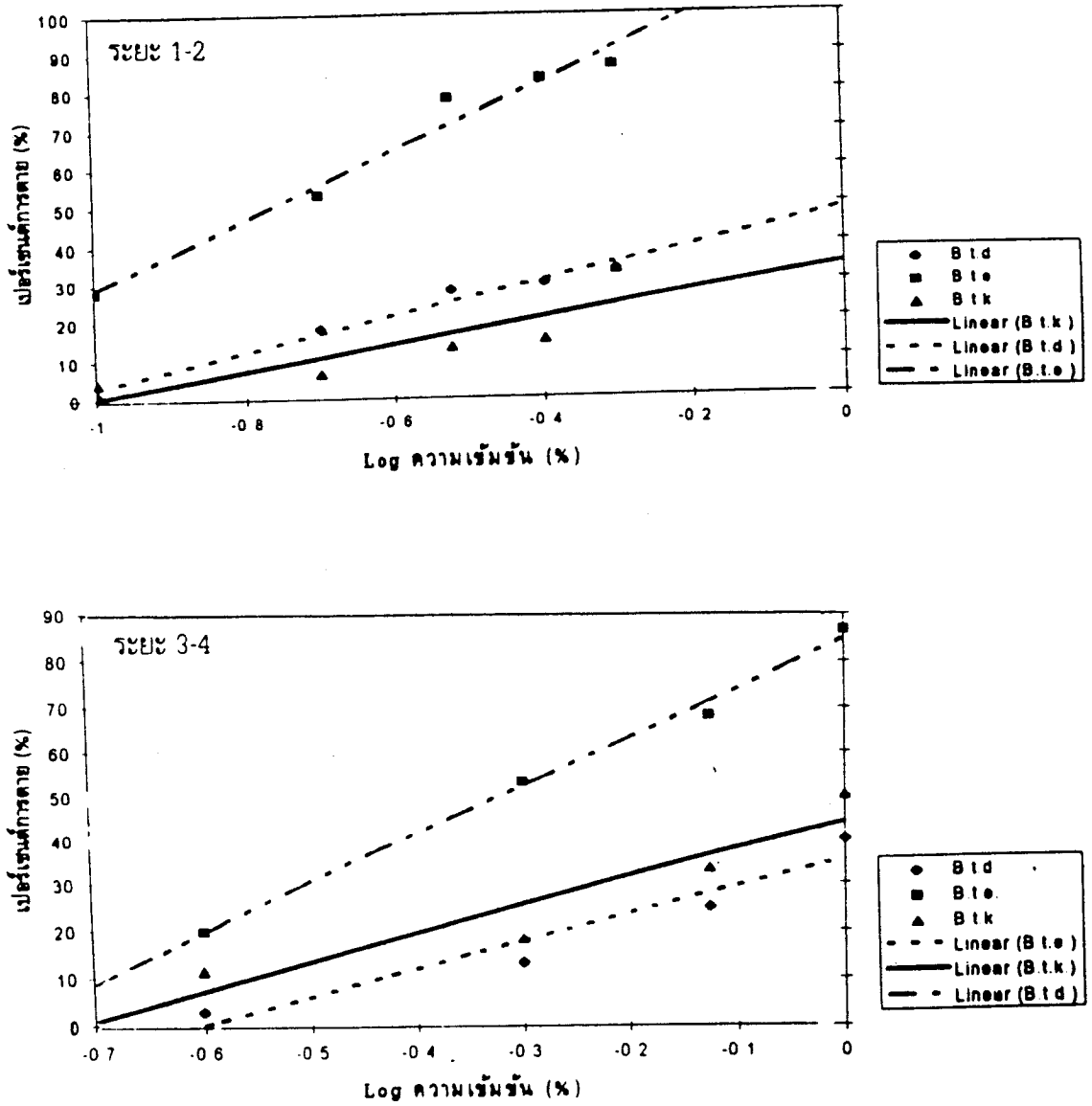
ภาพที่ 4.7 เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะ 1-2 ในรวงรังผึ้งของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

(อักษรเหมือนกันในกลุ่มเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$)

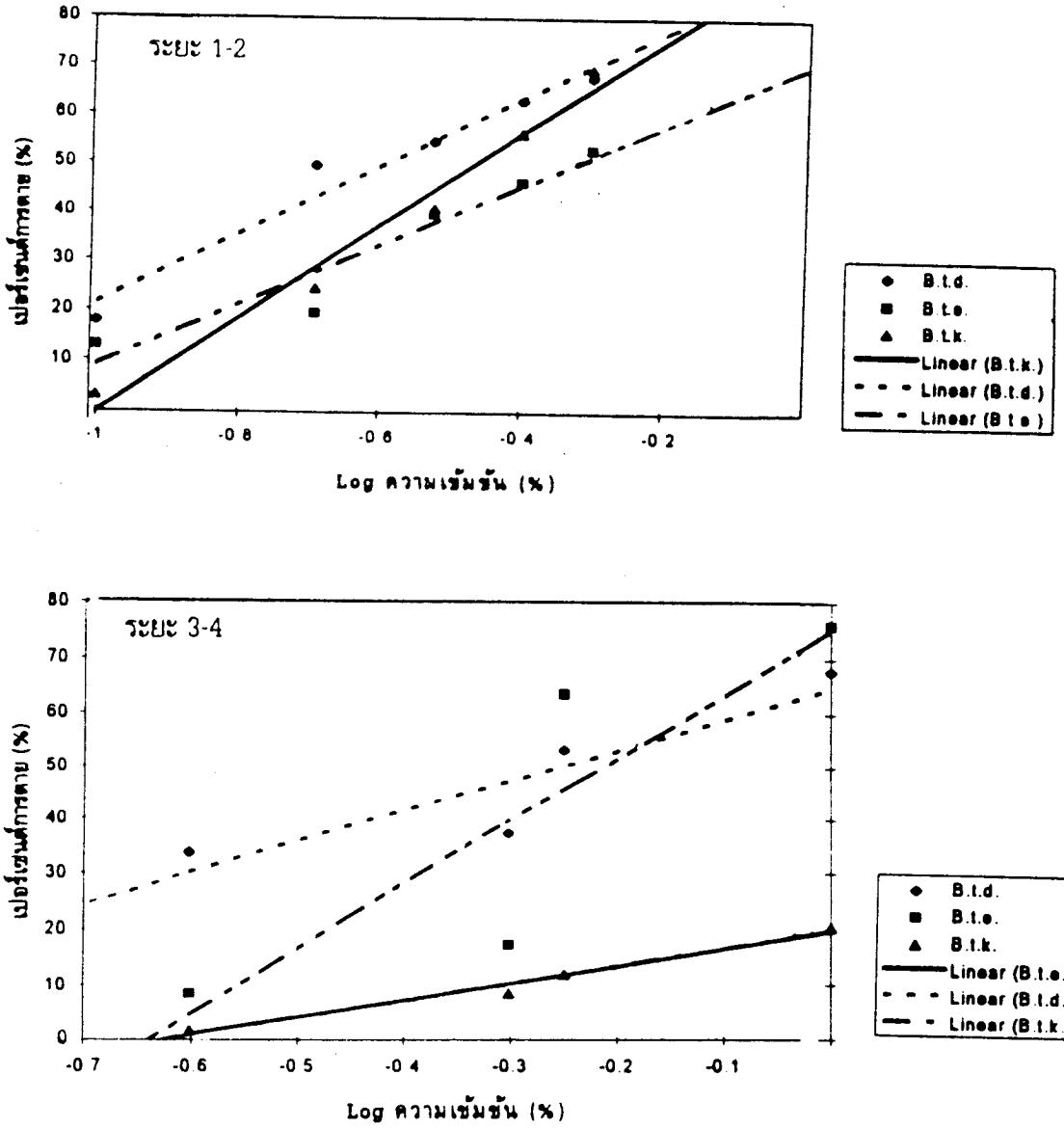


ภาพที่ 4.8 เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ระยะ 3-4 ในรวงรังผึ้งของ B.t.d, B.t.e และ B.t.k ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

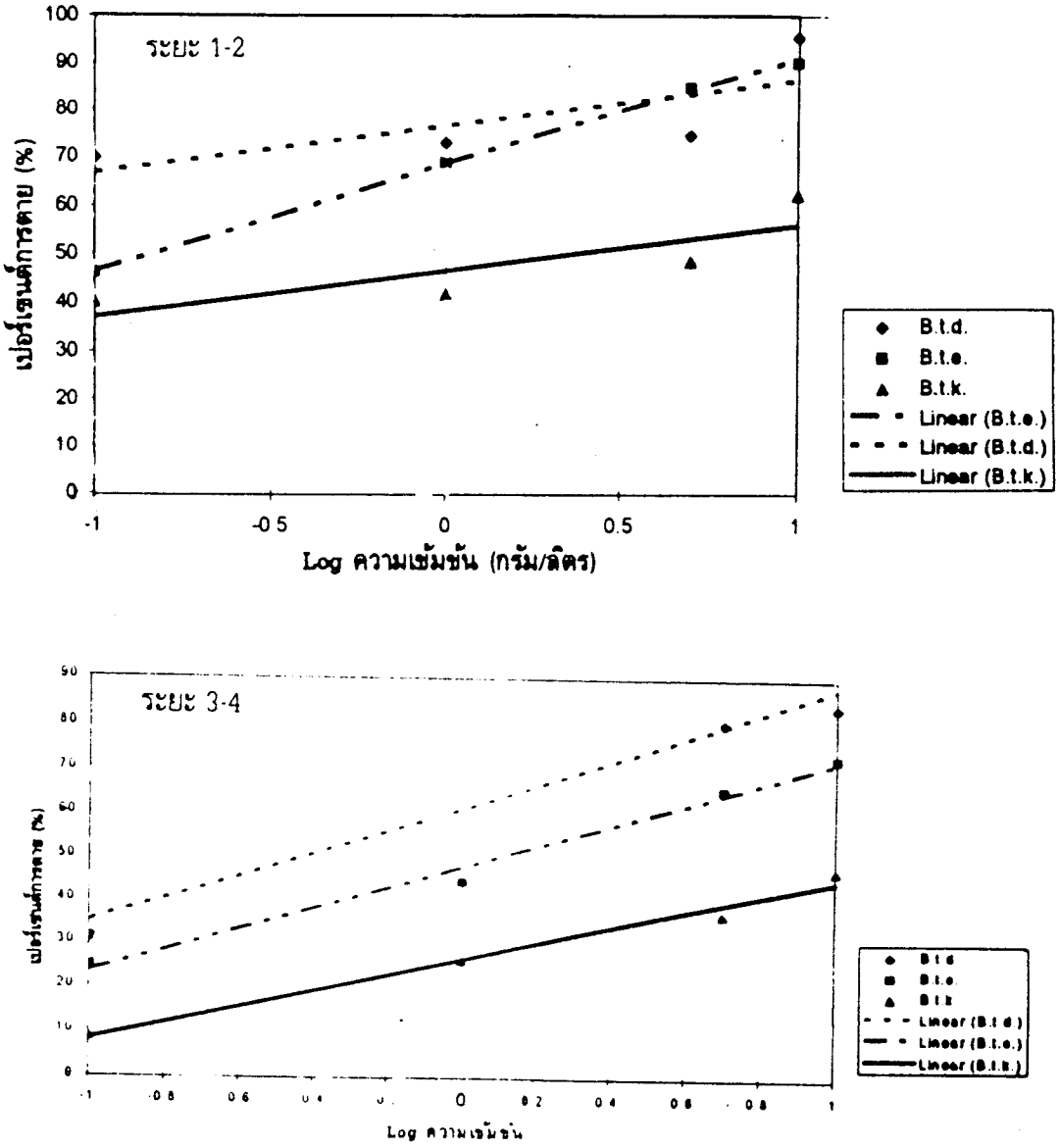
(อักษรเหมือนกันในกลุ่มเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$)



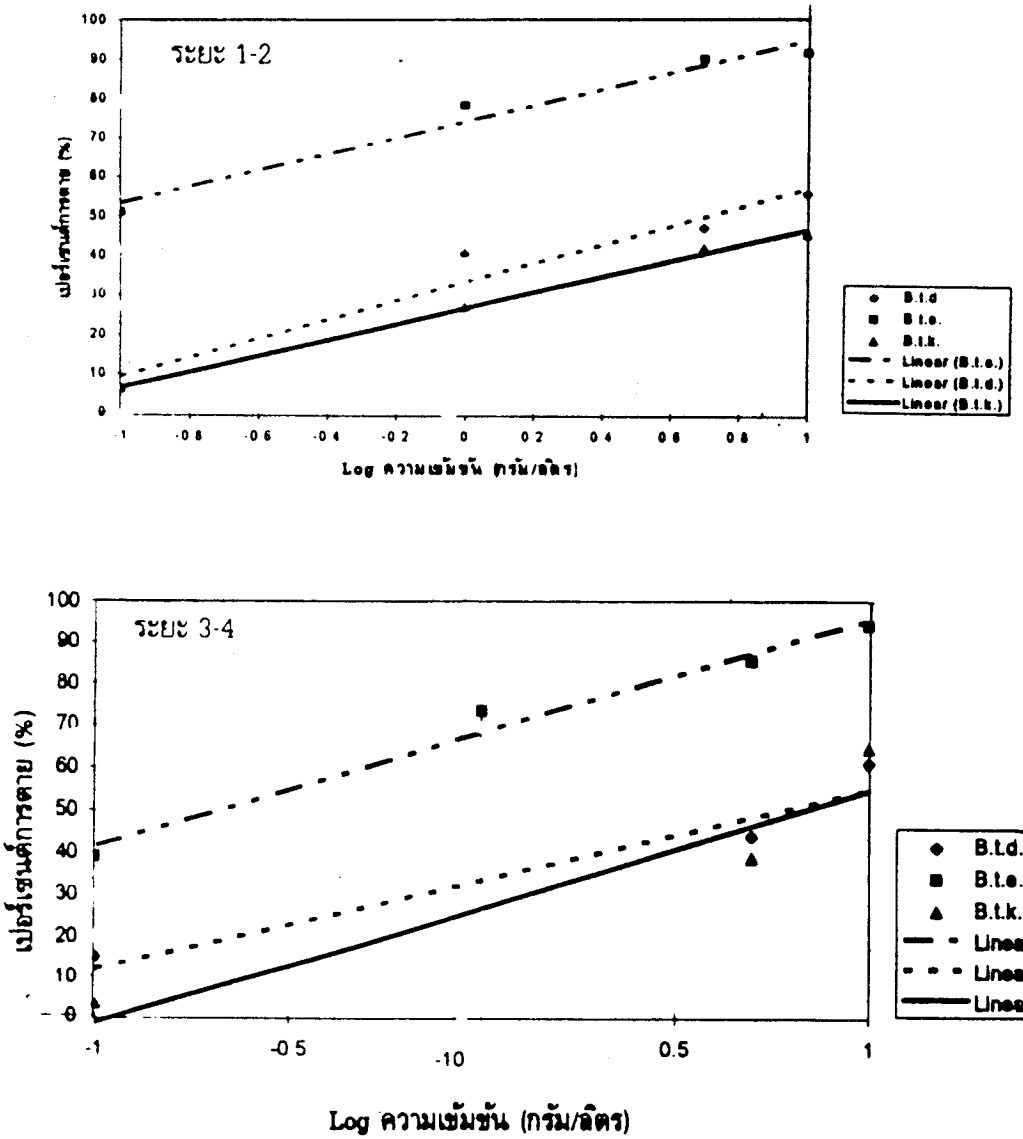
ภาพที่ 4.9 เปรียบเทียบความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ที่ 48 ชั่วโมง ในอาหารเทียม



ภาพที่ 4.10 เปรียบเทียบความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ที่ 48 ชั่วโมง ในอาหารเทียม



ภาพที่ 4.11 เปรียบเทียบความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* ที่ 48 ชั่วโมง ในรวงรังผึ้ง



ภาพที่ 4.12 เปรียบเทียบความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* ที่ 48 ชั่วโมง ในรวงรังผึ้ง

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 เนื่องจากการทำวิจัยครั้งนี้จะต้องใชระยะเวลาในการทำนาน 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 เพราะฉนั้นการควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งโดยวิธีนี้ จะต้องมีความรอบคอบและไม่ใช้ความเข้มข้นที่สูงเกินไป เพื่อป้องกันการเจือปนในน้ำผึ้ง แต่เนื่องจาก *Bacillus thuringiensis* มีความปลอดภัยต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมนุษย์ เมื่อเทียบกับการใช้สารเคมีแล้ว นับว่ามีความปลอดภัยสูงกว่าการใช้สารเคมีมาก

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลจากการคัดเลือกหาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆ ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กและหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ พอจะสรุปได้ว่าความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* แต่ละสายพันธุ์ขึ้นอยู่กับชนิดของผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งโดยที่ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กได้ดีที่สุด จากการทดสอบในอาหารเทียมและแผ่นรังผึ้ง ส่วน *Bacillus thuringiensis entomocidus* มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ได้ดีที่สุด และพบว่าค่า LC_{50} จะเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดของหนอนโตขึ้น เพราะฉะนั้นในการป้องกันกำจัดหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง เพื่อไม่ให้แผ่นรังผึ้งได้รับความเสียหายและเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัด จึงจำเป็นจะต้องป้องกันกำจัดตั้งแต่หนอนระยะเริ่มออกจากไข่ และจากการทดสอบกับหนอนของผึ้งโพรงพบว่ามีความปลอดภัยต่อหนอนของผึ้งโพรงจึงสามารถใช้ป้องกันผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งในหีบเลี้ยงผึ้งได้โดยไม่กระทบต่อประชากรของผึ้งภายในหีบเลี้ยงผึ้ง

ผลจากการทดลองชี้แนะ ได้ว่าสามารถที่จะใช้จุลินทรีย์ในการป้องกันกำจัดผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดเล็กและผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่ได้ โดยประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ การใช้จุลินทรีย์กำจัดแมลงสามารถกระทำได้ก็ต่อเมื่อเราได้ผลิตจุลินทรีย์กำจัดแมลง *Bacillus thuringiensis* ในรูปแบบของสูตรทางการค้าให้มีความคงทน และสามารถกระจายอยู่บนแผ่นรังผึ้งอย่างทั่วถึง เป็นสูตรที่สามารถละลายน้ำได้ดีเหมาะแก่การนำไปใช้ และวิธีการใช้ที่เหมาะสม การใช้แผ่นจุ่มลงในสารละลาย *Bacillus thuringiensis* จะใช้ในการป้องกันกำจัดผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งได้ผลดี เนื่องจากสารละลาย *Bacillus thuringiensis* สามารถกระจายได้ทั่วถึงทั้งแผ่นรังผึ้ง (Ali et al.,1972) การใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ในรูปของละลายน้ำ สามารถป้องกันการทำลายของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถที่จะใช้ป้องกับกำจัดได้นานถึง 2 ปี ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าสูตรน้ำซึ่งไม่มีความคงทนในสภาพธรรมชาติ (Burges and Bailey, 1968)

นอกจากนั้นการผลิต *Bacillus thuringiensis* เพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงจะต้องมีการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมและมีราคาถูก ทำให้ลดต้นทุนราคาอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับปรุงกระบวนการผลิตให้ได้ผลผลิตมากขึ้น และมีการนำเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพของการป้องกันกำจัดแมลงให้สูงขึ้นในอนาคตด้วย

ในการใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ในการป้องกันหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง จะต้องมีการสำรวจชนิดของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งก่อน เนื่องจาก *Bacillus thuringiensis* แต่ละสายพันธุ์จะมีความจำเพาะต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งไม่เหมือนกัน ซึ่ง *Bacillus thuringiensis dendrolimus* เหมาะที่จะใช้ควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก ในขณะที่ *Bacillus thuringiensis entomocidus* จะมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ และในการป้องกันกำจัดจะต้องกระทำในขณะที่หนอนอยู่ในระยะต้นๆ เพราะหนอนผีเสื้อขนาดเล็กจะมีความอ่อนแอต่อ *Bacillus thuringiensis* มากกว่าหนอนที่มีขนาดใหญ่ และเมื่อหนอนมีขนาดใหญ่ขึ้นจะสร้างใยหุ้มตัวเพื่อป้องกันศัตรู ทำให้การใช้แบคทีเรียไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากหนอนจะเจาะอยู่ภายในรวงรังซึ่งจะทำให้ไม่ได้รับเชื้อแบคทีเรียเข้าไป

เนื่องจากสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* มีความเฉพาะเจาะจงกับหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็กและหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ได้ไม่เหมือนกัน จึงควรมีการสำรวจชนิดของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งเพื่อสามารถใช้สายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* ในการป้องกันกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งถ้าพบว่ามีผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดเล็กเข้าทำลายมากก็จะใช้ *Bacillus thuringiensis dendrolimus* และถ้าพบว่ามีหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่เข้าทำลายมากก็จะใช้ *Bacillus thuringiensis entomocidus* ในการป้องกันกำจัด

เอกสารอ้างอิง

จักรา ภูอาษา. 2537 ชีววิทยาของผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella*). โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 40 หน้า.

จริยา จันทร์ไพแสง. 2536 *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ใหม่ที่พบในประเทศไทย วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 26 : 55- 66.

จรัญ จันทลักขณา. 2534 สถิติวิธีวิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย สำนักพิมพ์ ไทยวัฒนาพานิช จำกัด. 468 หน้า.

ประนอม ปัญจพัฒนศิริ. 2538. ความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็กสะเดาไทย *Azadirachta indica* var. *siamensis* Valeton ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* Linn. และหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* Fabr. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 76 หน้า.

ปรีชา อารีกุล. 2524 เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง วารสารกีฏและสัตววิทยา 3 : 22-23.

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2535. โรควิทยาของแมลง ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มีนา หวังสถิตสถาพร. 2527 ผลกระทบของ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 75 หน้า.

สุวณี สุภเวชย์ และ มาลัย วรจิตร. 2536 แบคทีเรียพื้นฐาน กรุงเทพมหานคร สำนักพิมพ์ศิริยอด. 248 หน้า.

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2532. ชีววิทยาของผึ้ง กรุงเทพมหานคร. บริษัทต้นอ้อ จำกัด. 184 หน้า.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2534. แบคทีเรียควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 148-166.

Ali, Ala-ud-Din D., Abdellatif, M. A., Bakry, N. M. and El-Sawaf, S. K. 1973. Studies on biological control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Journal of Apiculture Research 12 : 117-123.

Ali, A. and Young, S. Y. 1993. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* activity against larvae of *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton. Journal of Economic Entomology 86 : 1064-1068.

Ali, A. and Young, S. Y. 1993. Effects of rats and spray volume of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on activity against *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) and Persistence in cotton terminals. Journal of Economic Entomology 86 : 735-738.

Andrews, R. E. J. R., Iandolo, J. J., Cambell, B. S., Davidson, L. I. and Bulla, L. A. JR. Rocket immunoelectophoresis of entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Applied and Environmental Microbiology 40(5): 897-900.

Aronson, A. I., Beckman, W. and Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and relate insect pathogens. Microbiological Reviews 50 : 1-24.

Bargac. H. de, 1981. Identification of H-Serotypes of *Bacillus thuringiensis* in Microbial control of Pests and Plant Disseases ed. Burges, H.D. 35-43.

Beck, S. D. 1960. Growth and development of the greater wax moth. Transaction Wiscosin Academic Science. 19: 137-148.

Beegle, C. C.,Lewis, L. C., Lynch, R. E. and Martinez, A. J. 1981. Interaction of age and antibiotic on the susceptibility of three insect species to *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology 37 : 143-153.

Brewer, J., and Winter, D. 1986. Butterflies and moths. New York : Prentice hall press.

Burges, H. D. 1975. Teratogenicity of the thermostable beta Exotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella*. Journal of Invertebrate Pathology 26 : 419-420.

Burges, H. D. 1976. Leaching of *Bacillus thuringiensis* spores from foundation beewax into honey and their subseqoent survival. Journal of Invertebrate Pathology 28 : 393-394.

Burges, H. D. 1978. Control of wax moth : physical, chemical and biological methods. Bee World 59 : 127-129.

Burges, H. D. and Bailey, L. 1968. Control of the greater and lesser wax moth (*Galleria mellonella* and *Achroia grisella*) with *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology 11 : 184-195.

Burges, H. D., Hiller, S. and Chanter, D. O. 1975. Effect of ultraviolet and gamma rays on the activity of δ-endotoxins protien crystals of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology 25 : 5-9.

Burges, H. D. and Hussey, N. W. 1971. Microbial Control of Insects and Mites Academic Press. London and New York.

Burges, H. D., Thomson, E. M. and Latchford, R. A. 1976. Importance of spores and δ-endotoxins protien crystals of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella*. Journal of Invertebrate Pathology 27 : 87-94.

Calabrese, D. M., Nickerson, K. W. and Lane, L. C. 1980. A comparison of protien crystal sizes in *Bacillus thuringiensis*. Canada Journal of Microbiology 26: 1006-1010.

Calvert, p.III, 1980. Certan ™ a bacterial insecticide for control of wax moth aliterature review. American Bee Journal 122 : 200-202.

Cantwell, G. E. 1980. Control of the grearter wax moth-an update. America Bee Journal 120 : 581-583.

Cantwell, G. E., Knox D. A., Lehnert, T. and Michael. A. S. 1966. Mortality of the honey bee, *Apis mellifera*, in colonies theated with certain biology insecticides. Journal of Invertebrate Pathology 8 : 228-233.

Chestukhina, G.G., Kostina, L.I., Zalunin, I.A., Khodova, O.M., and Stepanov, V.M. 1988 *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleriae* simultaneously produces two δ-endotoxins differing strongly in primary structure and entomocidal activity. FEBS LETTERS 232(1) : 249-251.

Chilcott, C. N., Kalmakoff, J. and Pillai, J. S. 1981. "Biological significance of protease activity in *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals" WHO/VBC/81.835. World Health Organization Geneva.

Dorothy, G. 1971. Beewax as an import in mediaeval England. Bee World 52 : 68-73.

Dingman, D. W. and Stahly, D. P. 1984. Protection of *Bacillus* larvae from oxygen toxicity with emplasis on the role of catalase. Appied and Environmental Microbiology. 47 :1224-1237.

Dulmage, H. T. 1970. Production of Spore-δ-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. Journal of Invertebrate Pathology 16 : 385-389.

Dulmage, H. T. and Cooperatives. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential of pest control. in Microbial Control of Pests and Plant Disease (1970-1980) ed. Burges H.D. Academic Press. 193-222.

Dutxy, S.R., Trompson, J.V. and Cantwell, G. E. 1982. A technique for mass rearing the greater wax moth. Proceeding of the Entomological Society of Washington 84 : 56-58.

Falcon, L. A. 1971. Use of bacteria for microbial control. in Microbial Control of Insects and Mites. eds. Burges, H. D. and Hussey, N. W. Acardemic Press. 67-90.

Federici, B. A. 1982 The Development of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and Its Site of Action in Mosquito Larvae. Proceedings and Papers of the Forty-ninth Annual Conference of the California Mosquito and Vactor Control Association. 17-19.

Finney, D.M., 1971. Probit analysis. 3rd ed. New York : Cambridge Univ. Press.

Garcia, R., Federici, B. A., Hall, I. M., Mulla, M. S. and Schaefer, C. H. 1980a. "BTI-a potent New Biological Weapon" California Agriculture 3418-19.

Gebreyesus, M. 1978. Some aspects of the beeswax shortage in world markets. American Bee Journal 118 : 264-266, 279.

Gillum, M., and Argauer, R.J., 1981. Oxytetracycline residues in surplus honey, brood nest honey and lavae after medication of colonies of honey bee, *Apis mellifera*, with antibiotic extender patties, sugar dust, and syrup sprays. Environmental Entomology 10 : 479- 482.

Grzelak, K. and Kumaran A. K. 1986. Developmental changes in the larval fat body during metamorphosis in *Galleria mellonella*. Journal of Insect Physiology 32 : 445-453.

Groeters, F. R. Tabashnik, B. E. Finson, N. and Marshall, W. J. 1993. Resistance to *Bacillus thuringiensis* affects mating success of the diamonblack moth (Lepidoptera: Plutelldae). Journal of Economic Entomology 86 : 1035-1039.

Heimpel, A. M. and Angus, T. A. 1959. The site of action crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. Journal of Insect Pathology 1 : 152-170.

Hofte, H. and Whiteley, H. R. 1989 Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews. 53:242

Hoopinarner, R. and Materu, M. E. A. 1964. The toxicology and histopatholofy of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Galleria mellonella* (Linnaeus). Journal of Insect Pathology 6 : 26-30.

Hwang, W. I. and Su, Y. C. 1994. Characteristic of crystal protien of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Chinese Agricultural Chemical Society 32 : 486-496.

Ignoffo, C. M. and Garcia, C. 1977. Effect of antibiotics on insecticidal activity of *Bacillus thuingiensis*. Journal of Invertebrate Pathology 30 : 277-278.

Jaquet, F., Hutter, R. and Luthy, P. 1987. Specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxin. Applied and Environmental Microbiology 53 : 500-504.

Johnson, D.R. 1982. Suppression of *Heliothis* spp. on cotton by using *Bacillus thuringiensis*, *Baculovirus heliothis*, and two feeding adjuvants. Journal of Economic Entomology. 75: 207-210.

Knowles, B. H. and Dow, J. A. T. 1993. The crystal δ-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews 53 : 242-255.

Li, R. S., Jarrett, P. and Burges, H.D. 1987. Importance of spores, crystals and δ-endotoxins in the pathogenicity of different varieties of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. Journal of Invertebrate Pathology 50 : 277-284.

Mangum, W. 1989. Early methods of wax moth control. American Bee Journal. 129: 30-32.

Mcgaughey, W. H. and Johnson, D. E. 1992. Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae) resistance to different strains ans mixtures of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology. 85 : 1594-1600.

Medhat, E. N., Robbin, W. T. Timothy, L. T. and Dennis, L. B. 1990. Estimating honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony strength by a simple method: measuring cluster size. Journal of Economic Entomology 83 : 748-754.

Moberg, L. J. and Sugiyama, H. 1978. Affinity chromotography purification of type A botulinuni neurotoxin from crystalline toxin complex. Applied and Environmental Microbiology 35 : 878-880.

Morse, R. A, 1970. Honey Bee Pest Predater and Disease. Comstock Publishing London

Morse, R.A., ed., 1978. Honey Bee Pests, Predators and Diseases. London : Cornell Univ.

Napompeth, B. 1989. Appropriate non-chemical technology for agricultural workers. Technical Report of World Health Organizatio.

Navon, A. Federici, B. A., Walsh, T. S. 1992. Mandibular adduction force of Heliothis virescens (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed the insecticidal crystals of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology. 85 : 2138-2143.

Norris, J. R. 1971. The Protein Crytal Toxin of *Bacillus thuringiensis*. in Microbial Control of of Insects and Mites. eds. Burges H. D. and N.W. Hussey Academic Press : 67-90.

Payne, N. J. and Van-Frankenhuhuyzen, K. 1995. Effect of spay droplet size and density on efficacy of *Bacillus thuringiensis* Berliner against the spruce budworm, *Choristoneure fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). Canadian Entomologist 127 : 15-23.

Pruett, C. J. H. Burges. H. D. and Wybron, C. H. 1980. Effect of eposure to doil on potency viability of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology 35 : 168-174.

Real, L. 1983. Pollination Biological. New York; Acadimic Press.

Schesser, J. H. and Bulla, L. A. JR. 1978. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spores to the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Applied and Environmental Microbiology 35 : 121-123.

Shimanuki, H. and Knox, D. A. 1988. Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. American Bee Journal 128 : 353-354.

Singh, S. 1962. Beekeeping in India. New Delhi. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.

Smitley, D. R. and Davis, T.W. 1993. Aerial application of *Bacillus thuringiensis* for suppression of gypsy moth (Lepidoptera: Lymanteiidae) in *Populus-Quercus*. forests. Journal of Economic Entomology 86 : 1178-1184.

Somerville, H. J., Tanada, Y. and Esther, M. O. 1970. Lethal effect of purified spore and crystalline endotoxin preparations of *Bacillus thuringiensis* on several Lepidopterous insects. Journal of Invertebrate Pathology 16 : 241-248

Tabashnik, B. E. 1992. Resistance risk assessment: realied heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamonback moth (Lepidoptera: Plutellidae), tobacto budworm (Lepidoptera: Noctuidae) and cololado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of Economic Entomology 85 : 1551-1559.

Tabashnik, B. E., Finson, N. and Johnson, M. W. 1992. Two protease inhibitors fail to synergize *Bacillus thuringiensis* in daimondback (Lepidoptera: Plutellidae). Journal of Economic Entomology. 85 : 2082-2087.

Tabashnik, B. E., Finson, N., Chilcutt, C. F., Cushing, N. L. and Johnson, M. W. 1993. Increasing efficiency of bioassay: Evaluating ,resistance to *Bacillus thuringiensis* in daimondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). Journal of Economic Entomology 86 : 635-644.

Thomson, W. T. 1994. Agricultural chemicals book I insecticides. USA. 279.

Thorne, C. B. 1978. Transduction in *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Eicrobiology 35 : 1109-1115.

Trembley, A. and Burgett, M. 1979. Controlled release fumigation of the greater wax moth. Journal of Economic Entomology 72 : 616-617.

USDA. 1970. Rearing the Greater Wax Moth. USDA Science Study Aid No. 3.

Vandenberg, J. D. and Shimanuki, H. 1990. Viability of *Bacillus thuringiensis* and its efficacy for larvae of greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae) following storage of treated combs. Journal of Economic Entomology 83 : 760-765.

Vandenberg, J. D. 1990. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae) Journal of Economic Entomology 83 : 755-759.

Wallner, K. 1992. The residues of P-Dichorobenzene in wax and honey. American Bee Journal 132 : 538-541.

Wang, S. C. and Dauterman, W. C. 1995. Toxicity, penetration, excretion and metabolism of carbofuran in larvae of the tobacto budworm and the corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology 88 : 237-240.

Warren, G. W. Carozzi, N. B. Desai, N. and Koziel, M. G. 1992. Field evaluation of transgenic Tobacco containing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protien gene. Journal of Economic Entomology. 85 : 1651-1659.

Williams, J. L. 1976. Status of the greater wax moth , *Galleria mellonella*, in the United States beekeeping industry. American Bee Journal 116 : 524-526.

Winkins, D. W. H. 1979. Beewax for polish. American Bee Journal 119 : 47.

Wongsiri, S. and Chen, P. 1995. Effects of agricultural development on honey bees in Thailand. Bee World 76 : 1-3.

Yamamoto, T. and Powell, G.K. 1993. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins: Recent advancements in understanding the insecticidal activity. in Advance Engineered Pesticides. ed. Leo Kim, Marcel Dekker, Inc. New York

Zehnder, G. W. and Gelernter, W. D. 1989. Activity of the M-One formulation of a new strain of *Bacillus thuringiensis* against the Colorado potato beetle (Coleoptera : Chrysomelidae): relationship between susceptibility and insect life stage. Journal of EconomicEntomology 82 : 756-761.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

จากการศึกษาวงจรชีวิตของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* F. สามารถแบ่งระยะของตัวหนอนออกเป็น 8 ระยะตามความกว้างของ head capsule ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงระยะต่างๆของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* F.

ระยะ	ค่าเฉลี่ยความกว้างของ head capsule (มม.)	SD
1	0.17	0.023
2	0.30	0.016
3	0.41	0.021
4	0.60	0.032
5	0.86	0.041
6	1.05	0.013
7	1.18	0.010
8	1.32	0.022

ตารางที่ 2. ความยาวของตัวหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* F. ในระยะต่างๆ

ระยะ	ความยาวลำตัวเฉลี่ย (มม.)	SD
1	1.48	0.312
2	2.44	0.603
3	4.14	0.655
4	5.73	0.871
5	8.53	1.330
6	10.74	0.873
7	13.83	1.480
8	13.85	1.320

ตารางที่ 3. อายุของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก *Achroia grisella* F. ระยะต่างๆ

ระยะ	ระยะเวลา (วัน)
1	3
2	2
3	2.5
4	2.5
5	3
6	1
7	1
8	1

หมายเหตุ: ศึกษาที่อุณหภูมิ 35^{0} C ความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 65 %

จากการศึกษาวงจรชีวิตของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* L. สามารถแบ่งระยะของตัวหนอนออกเป็น 7 ระยะ ตามความกว้างของ head capsule ดังแสดงในตารางที่ 4-6 (จักรา ภูอาษา, 2538)

ตารางที่ 4 แสดงระยะต่างๆของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* L.

ระยะ	ค่าเฉลี่ยความกว้างของ head capsule (มม.)	SD
1	0.23	0.03
2	0.36	0.02
3	0.51	0.03
4	0.81	0.04
5	1.24	0.05
6	1.51	0.06
7	1.78	0.08

ตารางที่ 5. ความยาวของตัวหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* L. ในระยะต่างๆ

ระยะ	ความยาวลำตัวแลี่ย (มม.)	SD
1	1.55	0.38
2	3.16	0.43
3	4.69	0.81
4	8.38	1.42
5	12.93	1.47
6	16.26	1.17
7	19.36	2.71

ตารางที่ 6. อายุของหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* L. ระยะต่างๆ

ระยะ	ระยะเวลา (วัน)
1	4
2	1
3	1
4	2
5	2
6	2
7	1

หมายเหตุ: ศึกษาที่อุณหภูมิ 35°C ความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 65 %

ภาคผนวก ข

1. การคำนวนหาค่า 50 % lethal concentration (LC_{50})

ความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งสามารถประเมินค่า LC_{50} ได้โดยใช้ Probit analysis (Finney, 1971) เป็นวิธีการทางสถิติสำหรับสร้างสมการเส้นตรงจากข้อมูลทางชีววิทยาที่มีการกระจายสูง สามารถประเมินค่า LC_{50} ของจุลินทรีย์กำจัดแมลงต่อสัตว์ทดลองได้

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิเคราะห์โดย Probit analysis โดยโปรแกรมสำเร็จรูป คือ โปรแกรม SPSS ซึ่งในการคำนวนเพื่อประเมินค่า LC_{50} ตัวอย่างการคำนวนค่า LC_{50} ของ *B. thuringiensis* var. *entomocidus* ต่อหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งขนาดเล็ก ระยะ 1-2 ผลลัพธ์ที่ได้จากโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เป็นดังนี้

```
* * * * * * * * * * * * P R O B I T   A N A L Y S I S * * * * * * * * * * * *

DATA  Information

          5 unweighted cases accepted.
          0 cases rejected because of missing data.
          1 case is in the control group.
          0 cases rejected because LOG-transform can't be done.
MODEL Information

      ONLY Normal Sigmoid is requested.

- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

Hi-Res Chart  # 5:Probit transformation

 * * * * * * * * * * * * P R O B I T   A N A L Y S I S * * * * * * * * * * * *

 Parameter estimates converged after 10 iterations.
 Optimal solution found.

 Parameter Estimates (PROBIT model:  (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

           Regression Coeff.  Standard Error     Coeff./S.E.

   CON              2.55675          .33208         7.69920


                  Intercept  Standard Error  Intercept/S.E.

                    1.96811          .21984         8.95241

  Pearson Goodness-of-Fit Chi Square =      1.259    DF = 3   P =  .739

  Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity
  factor is used in the calculation of confidence limits.

- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
```

* * * * * * * * * * * * PROBIT ANALYSIS * * * * * * * *

Observed and Expected Frequencies

CON	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
-1.00	60.0	17.0	16.683	.317	.27805
-.70	60.0	32.0	34.309	-2.309	.57182
-.52	60.0	47.0	44.163	2.837	.73606
-.40	60.0	50.0	49.747	.253	.82911
-.30	60.0	52.0	53.078	-1.078	.88463

* * * * * * * * * * * * PROBIT ANALYSIS * * * * * * * *

Confidence Limits for Effective CON

Prob	CON	95% Confidence Limits Lower	Upper
.01	.02091	.00891	.03493
.02	.02673	.01237	.04255
.03	.03123	.01522	.04824
.04	.03512	.01780	.05302
.05	.03863	.02020	.05726
.06	.04189	.02251	.06115
.07	.04498	.02474	.06477
.08	.04794	.02692	.06820
.09	.05080	.02907	.07148
.10	.05358	.03120	.07465
.15	.06681	.04178	.08937
.20	.07963	.05265	.10322
.25	.09256	.06413	.11693
.30	.10596	.07647	.13092
.35	.12010	.08990	.14558
.40	.13525	.10463	.16127
.45	.15173	.12093	.17844
.50	.16992	.13905	.19769
.55	.19027	.15927	.21984
.60	.21346	.18193	.24612
.65	.24040	.20740	.27838
.70	.27248	.23631	.31937
.75	.31192	.26983	.37344
.80	.36258	.31031	.44804
.85	.43212	.36256	.55806
.90	.53886	.43794	.74075
.91	.56837	.45804	.79380
.92	.60226	.48080	.85594
.93	.64187	.50700	.93015
.94	.68919	.53781	1.02094
.95	.74743	.57506	1.13569
.96	.82217	.62193	1.28752
.97	.92438	.68454	1.50290
.98	1.08018	.77719	1.84700
.99	1.38075	.94845	2.55856

2. การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One Way Analysis of Variance

เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการทดลอง โดยการตรวจสอบที่ระดับความน่าจะเป็นที่ 5 เปอร์เซนต์ โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ซึ่งปรับปรุงจาก multiple comparison test ดังตัวอย่างต่อไปนี้

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable CON.5 concentration 0.50 %
By Variable BT Bt at 72 hr of GW3-4 in media

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	108.3333	54.1667	99.4898	.0000
Within Groups	15	8.1667	.5444		
Total	17	116.5000			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Me		
Bt.d	6	2.3333	.5164	.2108	1.7914	TO	2.87
Bt.e	6	8.1667	.7528	.3073	7.3767	TO	8.95
Bt.k	6	4.0000	.8944	.3651	3.0614	TO	4.93
Total	18	4.8333	2.6178	.6170	3.5315	TO	6.13

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Bt.d	2.0000	3.0000
Bt.e	7.0000	9.0000
Bt.k	3.0000	5.0000
TOTAL	2.0000	9.0000

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
.4511	2	15	.645

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable CON.5 concentration 0.50 %
By Variable BT Bt at 72 hr of GW3-4 in media

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05

The difference between two means is significant if
MEAN(J)-MEAN(I) >= .5217 * RANGE * SQRT(1/N(I) + 1/N(J))
with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3
RANGE	3.01	3.16

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

Mean	BT	B t . d	B t . k	B t . e
2.3333	Bt.d			
4.0000	Bt.k	*		
8.1667	Bt.e	*	*	

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group Bt.d

Mean 2.3333

- - - - - - - - - - -

Subset 2

Group Bt.k

Mean 4.0000

- - - - - - - - - - -

Subset 3

Group Bt.e

Mean 8.1667

ประวัติการศึกษา

นายสุรชัย ลีพิทักษ์รัตน์ เกิดวันที่ 29 มิถุนายน 2510 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สภาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปีการศึกษา 2533 และเข้าศึกษาต่อบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2536 จนสำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ในปีการศึกษา 2539