Original Article

นิพนธ์ต้นฉบับ

การสร้างความต้านทานของลูกน้ำยุงลาย *(Aedes aegypti)* ต่อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

นิตยา เมธาวณิชพงศ์
เลาจนา เชาวนาดิศัย
มงคล ริยะปาน
ทิพย์นลิน ตะเพียนทอง
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงลาย แต่การใช้ Bti เป็นเวลานานๆ จะมีโอกาสทำให้ลูกน้ำสร้างความต้านทานต่อ Bti ขึ้นได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวัดระดับความต้านทานของลูกน้ำยุงลาย โดยให้ลูกน้ำสัมผัสกับ Bti ในระดับที่มีผลทำให้มีอัตรารอดร้อยละ 10 เพื่อกระตุ้นให้ลูกน้ำยุงลายต้านต่อ Bti ในรุ่นต่อไป และวัดระดับความต้านทานของลูกน้ำยุงลายสายพันธุ์ที่ได้จากแหล่งเพาะพันธุ์ในประเทศไทยต่อ Bti โดยใช้ Standard Bti 2-06 เป็นแบคทีเรียมาตรฐาน พบว่าหลังกระตุ้นด้วย Bti จำนวน 25 รุ่นลูกน้ำ และวัดความต้านทานจากค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการตายร้อยละ 50 ลูกน้ำยุงลายบางรุ่นมีระดับความต้านทานคงที่ บางรุ่นมีความต้านทานเพิ่มขึ้น เมื่อกระตุ้นถึงรุ่นที่ 25 ลูกน้ำยุงลายสร้างความต้านทานต่อ Bti เพิ่มขึ้น 5 เท่าเทียบกับก่อนกระตุ้น ซึ่งถือว่าเป็นระดับความต้านทานที่ต่ำ ส่วนการวัดระดับความต้านทานของลูกน้ำยุงลายสายพันธุ์จาก 14 จังหวัดในทุกภาคของประเทศไทย พบว่าลูกน้ำจากทุกภาคมีระดับความต้านทานต่อ Bti น้อยมาก โดยลูกน้ำจากจังหวัดปทุมธานีมีค่าระดับความต้านทานสูงสุดที่ 2.04 และลูกน้ำจากจังหวัดชลบุรีมีค่าระดับความต้านทานต่ำสุดที่ 1.05 จึงสรุปได้ว่า Bti ยังมีศักยภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงลาย เนื่องจากโอกาสที่ลูกน้ำจะสร้างความต้านทานต่อแบคทีเรียชนิดนี้เกิดขึ้นน้อยมาก

คำสำคัญ: **บีทีไอ, ลูกน้ำยุงลาย, ระดับความต้านทาน, ค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการตายร้อยละ 50**

บทนำ

การควบคุมยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออกทั้งระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัยอาศัยเคมีกำจัดแมลงเป็นหลักเป็นเวลาหลายทศวรรษ อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีกำจัดแมลงถูกต่อต้านอย่างมากเนื่องจากแมลงมีการพัฒนาให้ดื้อต่อสารเคมีเหล่านั้น เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ สารเคมีปนเปื้อนสู่ห่วงโซ่อาหาร และทำลายแมลงอื่นที่มีประโยชน์[12] จึงจำเป็นที่ต้องหาทางเลือกที่มีประสิทธิภาพและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมในการควบคุมแมลงอย่างเร่งด่วน ระยะหลังได้นำวิธีการ

ควบคุมแบบอื่น ๆ มาเสริมเพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมีลง แบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุงเป็นเครื่องมืออีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนสารเคมีได้เช่นกัน ปริมาณการใช้งานเพื่อผลสำเร็จของการควบคุมอาจแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับพื้นฐานการดื้อหรือระดับความต้านทานต่อเคมีกำจัดแมลงของยุงลายในแต่ละท้องถิ่น กลุ่มแบคทีเรียซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในยุงได้รับการพัฒนาเพื่อการควบคุมแมลงโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อแก้ปัญหาแมลงดื้อยา เนื่องจากกระบวนการทำลายแมลงของแบคทีเรียแตกต่างจากสารเคมี[13] *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพกำจัดลูกน้ำยุงลายและริ้นดำ[1,3] และได้นำมาใช้ในการควบคุมแมลงพาหะนำโรคในหลายประเทศในทวีปอเมริกา ยุโรป และแอฟริกา เป็นระยะเวลาต่อเนื่องนานกว่า 20 ปี[11,12] กล่าวกันว่าโอกาสการสร้างความต้านทานของแมลงเป้าหมายต่อแบคทีเรียดังกล่าวอาจเกิดขึ้นได้แต่ใช้ระยะเวลายาวนานมาก[2] หากจะเปรียบเทียบกับการสร้างความต้านทานของแมลงต่อเคมีกำจัดแมลงประเภทออร์กาโนคลอรีน ออร์กาโนฟอสฟอรัส คาร์บาเมท และไพรีทรอยด์สังเคราะห์ แต่การใช้แบคทีเรียจะไม่ได้ผลเลยถ้าใช้ด้วยอัตราที่ไม่ถูกต้อง รวมทั้งหากมีแนวโน้มที่ลูกน้ำยุงลายสร้างความต้านทานได้แล้วจะทำให้การควบคุมยุงลายไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร จึงควรศึกษาให้ชัดเจนถึงโอกาสและระยะเวลาในการสร้างความต้านทานต่อแบคทีเรียของลูกน้ำยุงลาย

คณะผู้วิจัยจึงได้ติดตามการสร้างความต้านทานต่อ Bti เนื่องจากปัจจุบันจุลินทรีย์นี้ยังคงเป็นสารชีวภาพกำจัดลูกน้ำที่ใช้เป็นมาตรการเสริมในการป้องกันกำจัดยุงลายในประเทศไทย เพื่อให้หน่วยงานควบคุมแมลงพาหะได้ทราบถึงพัฒนาการสร้างความต้านทานต่อ Bti ของลูกน้ำยุงลาย ซึ่งจะสามารถใช้เป็นข้อมูลในการพิจารณาเลือกใช้วิธีกำจัดแมลงตามความเหมาะสม ทั้งนี้เพื่อให้การใช้จุลินทรีย์ชนิดนี้มีประสิทธิภาพสูงในงานควบคุมยุงพาหะระดับประเทศ

วิธีการศึกษา

รูปแบบการศึกษา

เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental study) โดยทดสอบหาระดับความต้านทานของลูกน้ำยุงลายสายพันธุ์มาตรฐานที่ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกำจัดลูกน้ำจำนวน 25 รุ่น และหาระดับความต้านทานของลูกน้ำที่เก็บจากพื้นที่ศึกษาทั้งหมด 14 จังหวัดจากทุกภาคของประเทศ

วิธีการทดสอบหาระดับความต้านทาน

1. ระดับความต้านทานของลูกน้ำยุงลายแต่ละรุ่นที่ถูกกระตุ้นด้วย Bti

ศึกษาโดยวิธี selective pressure โดยการให้ลูกน้ำยุงลาย *Ae. aegypti* รุ่นพ่อแม่ ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สัมผัสกับ Standard Bti 2-06 ที่มีระดับความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำมีอัตราตายร้อยละ 90 (LC_{90}) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้ลูกน้ำสร้างความต้านทานต่อ Bti แล้วนำลูกน้ำที่รอดชีวิตไปเลี้ยงต่อจนเป็นยุงตัวเต็มวัย เพาะเลี้ยงจนยุงวางไข่และฟักเป็นลูกน้ำรุ่นที่ 1 นำลูกน้ำไปทดสอบหาระดับความต้านทานต่อ Bti ทำเช่นนี้ทุกรุ่นต่อ ๆ กันเรื่อยไปจนกระทั่งลูกน้ำสร้างความต้านทานต่อ Bti อย่างน้อย 5 เท่า จึงยุติการทดสอบ การสร้างความต้านทาน การหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำตายร้อยละ 50 (LC_{50}) และเปรียบเทียบค่า LC_{50} ระหว่างลูกน้ำรุ่นต่าง ๆ กับลูกน้ำรุ่นพ่อแม่ เพื่อให้ได้ค่าระดับความต้านทาน (Resistance ratio; RR) ดังสมการ

$$\text{Resistance ratio} = \frac{LC_{50} \text{ ของลูกน้ำรุ่นต่าง ๆ}}{LC_{50} \text{ ของลูกน้ำรุ่นพ่อแม่}}$$

2. ระดับความต้านทานของลูกน้ำยุงลายจากแหล่งเพาะพันธุ์ในประเทศ

สุ่มเลือก 1-2 จังหวัดในแต่ละภาคของประเทศเป็นตัวแทนของพื้นที่ เก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงลายจาก

แหล่งเพาะพันธุ์ตามบ้านเรือน นำมาเพาะเลี้ยงจนยุงวางไข่และฟักเป็นลูกน้ำ จึงนำไปทดสอบกับ Standard Bti 2-06 โดยเปรียบเทียบกับลูกน้ำสายพันธุ์มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อให้ทราบค่าระดับความต้านทานของลูกน้ำจากแต่ละพื้นที่ ดังสมการ

$$\text{Resistance ratio} = \frac{LC_{50} \text{ ของลูกน้ำแต่ละพื้นที่}}{LC_{50} \text{ ของลูกน้ำสายพันธุ์มาตรฐาน}}$$

วัสดุ

1. แบคเรียกำจัดลูกน้ำยุงลายสายพันธุ์มาตรฐานที่มีชื่อว่า Standard Bti 2-06
2. ลูกน้ำยุงลาย จาก 2 แหล่งคือ

2.1 ลูกน้ำสายพันธุ์มาตรฐานจากห้องปฏิบัติการกลุ่มงานกีฏวิทยาทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

2.2 ลูกน้ำที่เก็บจากแหล่งเพาะพันธุ์ในแต่ละภาคของประเทศไทย

ปรกติลูกน้ำยุงลายลอกคราบ 4 ครั้ง จากลูกน้ำระยะที่ 1 จนถึงระยะที่ 4 ซึ่งเป็นระยะที่เจริญเต็มที่ โดยระยะที่เป็นลูกน้ำใช้เวลา 6-8 วัน จากนั้นจะลอกคราบครั้งสุดท้ายเป็นตัวโม่งหรือระยะดักแด้ซึ่งใช้เวลา 1-2 วันก็จะกลายเป็นยุงตัวเต็มวัย การศึกษานี้ใช้ลูกน้ำระยะที่ 4 ตอนต้น (ลอกคราบมาไม่เกิน 1 วัน) ซึ่งมีความแข็งแรงกว่าระยะอื่น

ขั้นตอนการทดสอบ

ทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำตายร้อยละ 50 (LC_{50}) ด้วยวิธีชีววิเคราะห์ (bioassay) ทำโดยเตรียม Standard Bti 2-06 ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ อย่างน้อย 4 ระดับที่ทำให้ลูกน้ำตายร้อยละ 1 - 99 ใส่ในถ้วยพลาสติกถ้วยละ 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 4 ถ้วย ใส่ลูกน้ำยุงลาย 10 ตัว/ถ้วย ทดสอบทั้งหมด 5 ครั้ง และมีชุดเปรียบเทียบเป็นน้ำเปล่าที่ไม่มี Bti บันทึกจำนวนลูกน้ำตายหลังการทดสอบ 24 ชั่วโมง ปรับอัตราตายด้วย Abbott's formula[15]

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Probit analysis[6] ในการหาค่า LC_{50} นำค่า LC_{50} จากการทดสอบทั้ง 5 ครั้งมาหาช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (95% CI) และหาค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Error; SE)

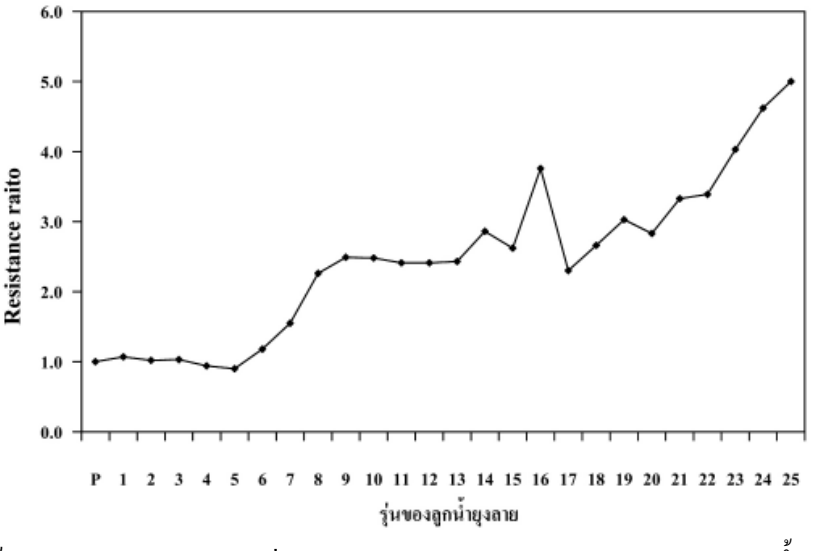
ผลการศึกษา

ระดับความต้านทานของลูกน้ำยุงลายแต่ละรุ่นที่ถูกกระตุ้นด้วย Bti

การให้ลูกน้ำยุงลายสัมผัสกับ Bti ด้วยความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการตายร้อยละ 90 เพื่อกระตุ้นให้สร้างความต้านทาน และทดสอบหาระดับความต้านทานของลูกน้ำยุงลายแต่ละรุ่นต่อแบคทีเรีย Bti ดังแสดงผลในตารางที่ 1 พบว่าลูกน้ำยุงลายก่อนกระตุ้นหรือลูกน้ำรุ่นพ่อแม่ (P) มีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.0170 ± 0.0010 mg/l หลังจากกระตุ้นและเพาะเลี้ยงต่อไป พบว่าลูกน้ำรุ่นที่ 1 ถึงรุ่นที่ 5 (ไม่แสดงข้อมูล) ยังมีค่า LC_{50} ใกล้เคียงกับรุ่นพ่อแม่ (Resistance ratio; RR 0.90 - 1.07) แต่เมื่อเข้าสู่รุ่นที่ 6 ค่า RR เริ่มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (1.18) และเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงรุ่นที่ 9 (2.49) หลังจากนั้นรุ่นที่ 10 ถึงรุ่นที่ 17 (ไม่แสดงข้อมูล) ค่า RR ค่อนข้างคงที่ (2.48 - 2.30) แต่มีบางช่วง (ลูกน้ำรุ่นที่ 15 - 17) ที่ค่า Resistance ratio ขึ้นลงผิดปรกติ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุจากความคลาดเคลื่อนในการทดสอบ และช่วงสุดท้ายในลูกน้ำรุ่น 18 ถึงรุ่นที่ 25 ค่า RR สูงขึ้นเป็น 2.66 - 5.00 และลักษณะกราฟที่ได้คล้ายกับขั้นบันได (รูปที่ 1) คือมีช่วงที่ลูกน้ำมีระดับความต้านทานคงที่ และบางช่วงลูกน้ำมีระดับความต้านทานสูงขึ้นเป็นลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าลูกน้ำยุงลายในช่วงแรก ตั้งแต่รุ่นพ่อแม่ถึงรุ่นที่ 5 ไม่แสดงความต้านทานต่อ Bti เลย หลังจากนั้นลูกน้ำในรุ่นที่ 6 ถึงรุ่นที่ 24 เริ่มมีการสร้างความต้านทานต่อ Bti มากขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยค่า RR

ตารางที่ 1 ค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการตายร้อยละ 50 (LC_{50}) และค่าระดับความต้านทาน (Resistance ratio) ต่อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* ของลูกน้ำยุงลาย 25 รุ่น

รุ่นของลูกน้ำยุงลาย	LC_{50} (mg/l) mean ± SE	95% CI		Resistance ratio (RR)
		Lower	Upper	
P	0.0170 ± 0.0010	0.0126	0.0214	1.00
1	0.0182 ± 0.0012	0.0142	0.0221	1.07
3	0.0175 ± 0.0013	0.0151	0.0205	1.03
6	0.0201 ± 0.0011	0.0167	0.0234	1.18
9	0.0423 ± 0.0024	0.0348	0.0498	2.49
12	0.0410 ± 0.0017	0.0357	0.0463	2.41
15	0.0446 ± 0.0025	0.0365	0.0527	2.62
18	0.0453 ± 0.0007	0.0431	0.0474	2.66
21	0.0567 ± 0.0026	0.0482	0.0651	3.33
24	0.0786 ± 0.0026	0.0704	0.0868	4.62
25	0.0851 ± 0.0017	0.0776	0.0927	5.00



รูปที่ 1 ค่าระดับความต้านทาน (Resistance ratio) ต่อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* ของลูกน้ำยุงลาย 25 รุ่น

1.18 - 4.62 ส่วนรุ่นสุดท้ายที่ทดสอบคือรุ่นที่ 25 ลูกน้ำยุงลายได้แสดงความต้านทานต่อ Bti สูงสุดโดยมีค่า RR 5.00

ระดับความต้านทานของลูกน้ำยุงลายจากแหล่งเพาะพันธุ์ในประเทศ

จากการสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงลายจากจังหวัดต่าง ๆ ในทุกภาคของประเทศไทย รวม 14 จังหวัด แล้วนำมาทดสอบหาระดับความต้านทานกับ Standard Bti 2-06 โดยเปรียบเทียบกับผลของลูกน้ำสายพันธุ์มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มีความไวต่อ Bti พบว่าลูกน้ำจาก 3 เขตในกรุงเทพฯ มีค่า RR อยู่ในช่วง 1.31 - 1.53 ลูกน้ำจากเขตปริมณฑลได้แก่ นนทบุรี ปทุมธานี และสมุทรปราการ มีค่า RR อยู่ใน

ช่วง 1.25 - 2.04 ลูกน้ำจากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ มีค่า RR อยู่ในช่วง 1.38 - 1.46, 1.18 - 1.36, 1.05 - 1.19, 1.06- 1.22 และ 1.16 - 1.29 ตามลำดับ จากข้อมูลที่ได้พบว่าลูกน้ำจากทั่วประเทศ มีค่า RR อยู่ในช่วง 1.05 - 2.04 โดยค่า RR สูงสุด (2.04) เป็นของลูกน้ำจากอำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานีและค่า RR ต่ำสุด (1.05) จากจังหวัดชลบุรี (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2)

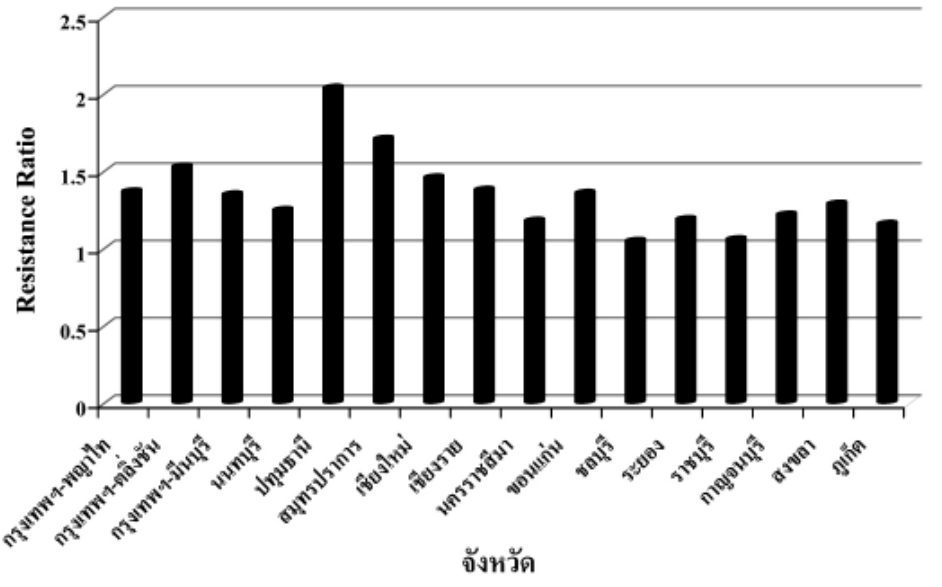
วิจารณ์

การพิจารณาว่าแมลงมีการดื้อหรือสร้างความต้านทานต่อจุลินทรีย์กำจัดแมลงยังไม่มีหลักเกณฑ์ที่ชัดเจน แต่สำหรับสารเคมีกำจัดแมลงได้มีการกำหนดหลักเกณฑ์การพิจารณาไว้ว่า หากค่า RR สูงกว่า 10 แสดงว่าแมลงสร้างความต้านทานต่อสารเคมีชนิดนั้น ๆ มาก[16] จากการศึกษาครั้งนี้ลูกน้ำยุงลายที่ถูกกระตุ้นให้สร้างความต้านทานด้วย Bti ที่มีความเข้มข้นสูงเพื่อคัด

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการตายร้อยละ 50 (LC_{50}) และค่าระดับความต้านทาน (Resistance ratio) ต่อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* ของลูกน้ำยุงลายจากจังหวัดต่าง ๆ

ลำดับที่	จังหวัด	LC_{50} (mg/l) mean ± SE	95% CI		Resistance ratio
			Lower	Upper	
	ภาคกลาง				
1	กรุงเทพมหานคร				
	- เขตพญาไท	0.0223 ± 0.0006	0.0202	0.0243	1.31
	- เขตดลิ่งชัน	0.0261 ± 0.0034	0.0152	0.0369	1.53
	- เขตมีนบุรี	0.0230 ± 0.0009	0.0199	0.0260	1.35
2	นนทบุรี อำเภอปากเกร็ด	0.0212 ± 0.0011	0.0178	0.0246	1.25
3	ปทุมธานี อำเภอเมือง	0.0347 ± 0.0031	0.0250	0.0444	2.04
4	สมุทรปราการ อำเภอบางพลี	0.0290 ± 0.0003	0.0281	0.0298	1.71
	ภาคเหนือ				
5	เชียงใหม่	0.0249 ± 0.0014	0.0204	0.0294	1.46
6	เชียงราย	0.0235 ± 0.0017	0.0188	0.0282	1.38
	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ				
7	นครราชสีมา	0.0201 ± 0.0014	0.0156	0.0246	1.18
8	ขอนแก่น	0.0232 ± 0.0008	0.0206	0.0257	1.36
	ภาคตะวันออก				
9	ชลบุรี	0.0179 ± 0.0008	0.0155	0.0204	1.05
10	ระยอง	0.0202 ± 0.0008	0.0175	0.0228	1.19
	ภาคตะวันตก				
11	ราชบุรี	0.0181 ± 0.0005	0.0165	0.0196	1.06
12	กาญจนบุรี	0.0208 ± 0.0006	0.0189	0.0228	1.22
	ภาคใต้				
13	สงขลา	0.0220 ± 0.0003	0.0211	0.0228	1.29
14	ภูเก็ต	0.0198 ± 0.0002	0.0192	0.0205	1.16

หมายเหตุ : *ลูกน้ำสายพันธุ์มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีค่า LC_{50} 0.0170 ± 0.0010 mg/l*



รูปที่ 2 ค่าระดับความต้านทาน (Resistance ratio) ต่อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* ของลูกน้ำยุงลายจากจังหวัดต่าง ๆ

เลือกตัวที่รอดชีวิตในแต่ละรุ่นมาเพาะเลี้ยงเป็นลูกน้ำรุ่นต่อไป พบว่าหลังการกระตุ้นได้ 25 รุ่น ค่า LC_{50} เพิ่มขึ้นจาก 0.0170 เป็น 0.0851 mg/l โดยมีค่า RR เพิ่มเป็น 5 เท่า เมื่อเทียบเคียงกับเกณฑ์การพิจารณาการดื้อหรือต้านทานต่อสารเคมี แสดงว่าลูกน้ำยุงลายมีความต้านทานต่อ Bti เพียงเล็กน้อยแม้จะได้ถ่ายทอดความต้านทานมาถึง 25 รุ่น ซึ่งถือว่าเป็นระยะเวลาที่ยาวนาน สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Becker and Ludwig[2] ที่พบว่าการสร้างความต้านทานของลูกน้ำยุงลายหรือแมลงเป้าหมายอื่น ๆ กับแบคทีเรียสามารถเกิดขึ้นได้แต่ใช้ระยะเวลายาวนานมากเมื่อเปรียบเทียบกับการสร้างความต้านทานของแมลงต่อเคมีกำจัดแมลงประเภทออร์กาโนคลอรีน ออร์กาโนฟอสฟอรัส คาร์บาเมท และไพรีทรอยด์สังเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีผลการทดสอบของ Huang et al.[10] ที่ได้ทดสอบการสร้างความต้านทานของลูกน้ำยุงลายในห้องปฏิบัติการพบว่าลูกน้ำไม่สร้างความต้านทานต่อ Bti เช่นเดียวกัน

การที่ลูกน้ำยุงลายสร้างความต้านทานต่อ Bti ได้น้อยและใช้เวลานานน่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกการทำลายลูกน้ำของ Bti เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้มีโปรตีนที่เป็นสารพิษ (toxin protein) แตกต่างกันถึงสี่ชนิด คือ Cry4A, Cry4B, Cry11Aa และ Cyt1Aa[5] และมีกลไกการทำงานที่ซับซ้อน รวมทั้งโปรตีนแต่ละชนิดมีการทำงานเสริมฤทธิ์กัน ลูกน้ำจึงมีโอกาสสร้างความต้านทานได้ยาก[14] แตกต่างจากกลไกการทำลายของสารเคมีที่ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในตัวแมลง ซึ่งแมลงสามารถพัฒนาให้ต้านทานต่อสารเคมีได้ไม่ยาก[9]

สำหรับระดับความต้านทานของลูกน้ำยุงลายจากแหล่งเพาะพันธุ์ในทุกภาคของประเทศไทย พบว่าลูกน้ำทุกพื้นที่มีความต้านทานต่อ Bti น้อยมาก โดยมีค่า RR อยู่ในช่วง 1.05 - 2.04 ดังนั้นลูกน้ำยุงลายที่เก็บตัวอย่างจากทุกภาคของประเทศยังคงมีความไวต่อแบคทีเรียชนิดนี้ อย่างไรก็ตามการใช้ Bti ควบคุมลูกน้ำยุงลายในประเทศไทยถือว่ายังใช้น้อยมากเมื่อเทียบกับการใช้สารเคมี การที่ลูกน้ำแต่ละพื้นที่มีระดับความต้านทานต่อ Bti ที่แตกต่างกัน อาจเป็นเพราะพื้นฐานความต้านทานของลูกน้ำและยุงตัวเต็มวัยต่อเคมีกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ มีความแตกต่างกัน[4,8] อย่างไรก็ตามในประเทศที่มีการใช้ Bti ในปริมาณมากมาเป็น

เวลานานกว่าสิบปีอย่างแอฟริกา อเมริกาและเยอรมัน ก็มีรายงานว่าไม่พบปัญหาลูกน้ำสร้างความต้านทาน เช่นกัน[7]

สรุป

หากมีการใช้ Bti ในการควบคุมลูกน้ำยุงลายอย่างต่อเนื่อง โอกาสที่ลูกน้ำยุงลายจะสร้างความต้านทานต่อ Bti ก็อาจเกิดขึ้นได้แต่น้อยมาก ดังนั้นการใช้ Bti ก็ยังคงมีข้อควรระวังเรื่องความต้านทานหรือการดื้อต่อแบคทีเรียกำจัดลูกน้ำถึงแม้ว่าจะมีน้อยมากเมื่อเทียบกับการใช้สารเคมีกำจัดลูกน้ำ ซึ่งปัจจุบันพบปัญหาว่าลูกน้ำและแมลงชนิดอื่น ๆ มีการสร้างความต้านทานต่อเคมีกำจัดแมลงมากขึ้นเรื่อย ๆ ส่วนลูกน้ำยุงลายที่เก็บตัวอย่างจากทั่วทุกภาคของประเทศไทย พบว่ายังไม่มีปัญหาการสร้างความต้านทาน ลูกน้ำยังคงมีความไวต่อความเป็นพิษของ Bti จึงสามารถนำ Bti มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมประชากรลูกน้ำยุงลายได้ต่อไป ในอัตราการใช้ปรกติไม่ต้องเพิ่มปริมาณแต่อย่างใด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณนันทพร ผลสุวรรณ์ และคุณอัจฉริยะ อุนาท ฝ่ายศึกษาควบคุมแมลงทางชีววิธี ที่ได้ช่วยเก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงลายในทุกพื้นที่ศึกษา และเพาะเลี้ยงยุงในแต่ละรุ่น และขอขอบคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่สนับสนุนอุปกรณ์และสถานที่ในการศึกษาวิจัยจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Araujo-Coutinho CJPC, Lacey LA. Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for control of blackflies in the north littoral zone of Brazil Sao Paolo State. Entomol Abst 1990; 22:84.
2. Becker N, Ludwig M. Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis.* J Am Mos Cont Assoc 1993; 9:221-4.
3. Chowanadisai L. Effectiveness of bacterial larvicide products from Thai strain *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis.* Biotechnol B. thuringiensis 2005; 5:365-82.
4. Chowanadisai L. Factors influencing the larvicidal activity of bacterial toxin. Indian J Malariol 1998; 35:117-22.
5. Crickmore N, Zeigler DJ, Feitelson J, Schnepf E, Lambert B, Lereclus D, et al. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal cry Genes. Program and Abstracts of the 28th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology; 1995. p. 14.
6. Finney JD. Probit Analysis. 3rd ed. Cambridge: The University Press; 1971.
7. Glare TR, O'Callaghan M. Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis.* Report for the Ministry of Health. Biocontrol & Biodiversity, Grasslands Division. Lincoln: AgResearch; 1998.
8. Goldman IF, Arnold J, Carton BC. Selection for reistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti.* J Inverte Pathol 1986; 47:317-24.
9. Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annu Rev Entomol 2000; 45:371-91
10. Huang F, Buschman LL, Higgins RA, McGaughey WH. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. Science 1999; 284:965-7.
11. Monsour CJ, Reid S, Teakle RE, editors. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in mosquito control. Proceedings of the 1st Brisbane Symposium Biopesticides: opportunities for Australian Industry; 1994 June 9-10; Brisbane, Australia. Brisbane: University of Queensland; 1994.
12. Poopathi S, Abidha S. Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*): Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance. J Physiol Pathol 2010; 1(3):22-38.
13. Soberón M, Fernández LE, Pérez C, Gill SS, Bravo A. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis toxins.* Toxicon 2007; 49(5):597-600.
14. Whalon ME, McGaughey WH. *Bacillus thuringiensis:* Use and Resistance management. In: Ishaaya I, Degheele D, editors. Insecticides with novel modes of action: mechanism and application. Berlin: Springer; 1998. p. 106-37.
15. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquito to organochlorine, organophosphate and carbamate

insecticides. Establishment of base line. WHO 1981; WHO/VBC/81.805:1-7.

16. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO; 1982; WHO/VBC/81.807:1-6.

Abstract **Resistance Development to Bacterial Larvicide of *Aedes aegypti***

Nittaya Methawanitpong, Laojana Chaowanadisai, Mongkon Riyapan, Tipnalin Tapienthong

National Institute of Health, Department of Medical Sciences

Journal of Health Science **2012; 21:23-30.**

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (Bti) is known to be highly effective against *Aedes aegypti* larvae. Resistance to Bti among populations of *Ae. aegypti* could occur in the long run. This laboratory study to determine levels of resistance of *Ae. aegypti* larvae to Bti was carried out. The technique selection of resistance colonies was made by serial exposure to bacterial larvicide. Each generation survivors designed at 10 percent were subsequently subjected to Bti selection. This process was confined to 25 generations. As a result, a low level of resistance was found and the resistance ratio at LC_{50} was 5.0 when compared with the non-selected group. Another study on resistance of *Ae. aegypti* larvae from each of 14 provinces in 6 parts was conducted and all of them showed very low resistance ratio to Bti. Larvae from Pathum Thani province yielded the highest resistance ratio at 2.04 while larvae from Chonburi province showed the lowest at 1.05. In conclusion, Bti still is a potential larvicide for *Ae. aegypti* larvae control, because the resistance of *Ae. aegypti* larva to Bti is slowly developed.

Key words: ***Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), *Aedes aegypti* larva, resistance ratio, LC_{50}**