

ประสิทธิภาพและอายุการใช้งานของแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* ที่เพาะเลี้ยงด้วยสิ่ง
เหลือทิ้งในครัวเรือนต่อการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus*

พรธิดา เพชรสุวรรณ,วท.บ

คนาพร สารพฤกษ์,วท.บ

นิตยา เมฆาณิชนพศ์,วท.ม

นันทพร ผลสุวรรณ,วท.บ

พรชัย วิริยะสรานนท์,วท.บ

อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์,พ.บ., ปร.ค.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

วันที่รับบทความ (Received), 30 ตุลาคม 2567

วันแก้ไขบทความ (Revised), 12 พฤศจิกายน 2567

วันตอบรับบทความ (Accepted), 15 มกราคม 2568

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* (*L. sphaericus*) ที่เพาะเลี้ยงจากสิ่งเหลือทิ้งในครัวเรือน ได้แก่ น้ำกากถั่วเหลือง น้ำมะพร้าวแก่ และน้ำข้าวข้าว โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบแต่ละชนิดจะถูกเติมน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0, 2.5 และ 5 แล้วนำไปทดสอบกับลูกน้ำยุงรำคาญสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ (NIH strain) ระยะ 4 ตอนต้น ผลทดสอบพบว่าน้ำกากถั่วเหลืองที่ไม่มีการเติมน้ำตาล มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมะพร้าวแก่ และน้ำข้าวข้าว โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.42 ppm จากการศึกษาความคงตัว ในระหว่างการเก็บรักษาแบคทีเรีย *L. sphaericus* ที่ได้จากน้ำกากถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 23-28 °C และ 25-35 °C นาน 12 เดือน พบว่าแบคทีเรีย *L. sphaericus* เก็บที่อุณหภูมิ 23-28 °C มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ดีกว่าแบคทีเรียที่เก็บที่อุณหภูมิ 25-35 °C ดังนั้น กากถั่วเหลืองสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีประสิทธิภาพสำหรับการผลิตแบคทีเรีย *L. sphaericus* ในราคาประหยัด และแบคทีเรีย *L. sphaericus* ที่ได้ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25-35 °C เพื่อรักษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญให้คงอยู่ตลอดอายุ 12 เดือน

คำสำคัญ: ยุงรำคาญ, ไลซินาบาซิลลัส, น้ำกากถั่วเหลือง, น้ำมะพร้าวแก่, น้ำข้าวข้าว

Efficacy and shelf life of *Lysinibacillus sphaericus* cultured with household waste against *Culex quinquefasciatus*

Porntida Petsuwan, B.Sc.

Danaporn Saraprug, B.Sc.

Nittaya Methawanitpong, M.Sc.

Nuntaporn Phonsuwan, B.Sc.

Pornchai Wiriysaranont, B. Sc

Archawin Rojanawiwat, M.D., Ph.D.

National Institute of Health of Thailand

Abstract

This study aimed to determine the efficacy of *Lysinibacillus sphaericus* cultured from household waste culture materials, including soy pulp water, mature coconut water, and rice washing water. Each test medium was supplemented with sugar at concentrations of 0%, 2.5%, and 5%, and then tested against the early fourth instar larvae of the laboratory strain (NIH strain) of *Culex quinquefasciatus*. The results showed that soy pulp water without added sugar was the most effective in controlling the mosquito larval, with LC_{50} of 0.42 ppm when compared with mature coconut water and rice washing water. In a study on storage stability, *L. sphaericus* from soy pulp water was stored at temperatures of 23-28 °C and 25-35 °C for 12 months. The results showed that storage of *L. sphaericus* stored at 23-28 °C was more effective against *Cx. quinquefasciatus* larvae than when stored at 25-35 °C. Therefore, soy pulp could be considered a cost-effective medium for economical production of *L. sphaericus* toxins, and *L. sphaericus* should be stored at temperatures between 25-35 °C to maintain its efficacy against *Cx. quinquefasciatus* larvae throughout the year).

Keywords: *Culex quinquefasciatus*, *Lysinibacillus sphaericus*, soy pulp water, mature coconut water, rice washing water

บทนำ

หลังจากประเทศไทยเข้าสู่ประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน ทำให้มีการเคลื่อนย้ายของประชากรจากประเทศเพื่อนบ้านเข้าสู่ประเทศไทยเพิ่มขึ้น ส่งผลให้คนไทยมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคติดต่อข้ามพรมแดนมากขึ้น ทั้งโรคติดต่อจากคนสู่คนโดยตรงและโรคติดต่อนำโดยยุงรำคาญ เช่น โรคเท้าช้าง และไข้สมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis; JE) องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จัดให้โรคเท้าช้างเป็นโรคอันดับสองที่ก่อให้เกิดความพิการถาวรทั่วโลก โดยพบการระบาดในประเทศเขตร้อน ปัจจุบันโรคเท้าช้างยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศเมียนมาร์ โดยพบในอุบัติการณ์ที่สูง อย่างไรก็ตามในปี พ.ศ. 2560 ประเทศไทยได้รับการประกาศว่าสามารถกำจัดโรคเท้าช้างได้แล้ว หลังจากดำเนินการกำจัดมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544⁽¹⁾ แต่ไม่ได้หมายความว่าจะไม่พบผู้ป่วยโรคเท้าช้างในประเทศไทย เพียงแต่เป็นการลดการแพร่ระบาดของโรคจนเหลือต่ำลง นอกจากนี้การที่แรงงานจากประเทศเมียนมาร์เข้ามาทำงานและอาศัยในประเทศไทยเป็นจำนวนมากถึง 3 ล้านคน⁽¹⁾ ถึงแม้จะมีการป้องกันโรคโดยการฉายารักษาโรคเท้าช้างให้กับแรงงานชาวเมียนมาร์อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานหลายปี แต่ความเสี่ยงของโรคเท้าช้างที่จะกลับมาแพร่ระบาดก็ยังคงมีอยู่เนื่องจากแรงงานเหล่านี้มีการเคลื่อนย้ายกลับไปประเทศ จึงมีโอกาสรับเชื้อโรคเท้าช้างจากประเทศตนเองกลับมาอีก นอกจากนี้ยุงรำคาญเป็นพาหะนำโรคไข้สมองอักเสบเจอี ซึ่งโดยส่วนใหญ่พบโรคนี้ในเด็กอายุ 5-10 ปี และพบการแพร่ระบาดในภาคเหนือช่วงฤดูฝนมากกว่าภาคอื่นๆ ประเทศไทยได้ดำเนินการฉีดวัคซีนโรคไข้สมองอักเสบเจอีชนิดเชื้อตายให้แก่เด็กครอบคลุมพื้นที่ทั่วประเทศตั้งแต่ พ.ศ. 2533 แต่จากการตรวจวิเคราะห์ภาวะภูมิคุ้มกันต่อโรคไข้สมองอักเสบเจอีจากตัวอย่างน้ำเหลืองพบว่าประชากรไทยประมาณครึ่งหนึ่งยังคงมีความไวต่อการติดเชื้อไข้สมองอักเสบเจอี⁽²⁾ ดังนั้นความเสี่ยงของการเกิดโรคไข้สมองอักเสบเจอีในประเทศไทยจึงยังคงมีอยู่ จากข้อมูลความเสี่ยงของโรคเท้าช้างและไข้สมองอักเสบเจอีแสดงให้เห็นว่าการกำจัดยุงรำคาญเพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดโรคจึงมีความสำคัญ ซึ่งการกำจัดยุงนิยมนำสารเคมีกำจัดในระยะที่เป็นลูกน้ำและยุงตัวเต็มวัย อย่างไรก็ตามพบว่าสารเคมีเหล่านี้มีอันตรายต่อสุขภาพ และเมื่อใช้เป็นเวลานานจะทำให้ยุงที่รอดชีวิตเกิดการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลง⁽³⁾ ส่งผลให้การกำจัดยุงยากซับซ้อนขึ้น ตลอดจนเกิดปัญหาสารเคมีตกค้างเป็นพิษต่อระบบนิเวศ ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์จำเพาะชนิดที่มีคุณสมบัติก่อโรคในแมลงจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ *Lysinibacillus sphaericus* (*L. sphaericus*) ซึ่งสามารถผลิตโปรตีนที่เมื่อลูกน้ำยุงกินเข้าไปแล้ว ผลึกโปรตีนนี้จะละลายในสภาวะที่เป็นด่างในกระเพาะของลูกน้ำยุง และทำลายเยื่อทางเดินอาหาร ทำให้ลูกน้ำตายในที่สุด มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำได้ดีและมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นในระดับต่ำ เนื่องจากพิษของแบคทีเรียมีความจำเพาะเจาะจงสูง โดยไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อแมลงชนิดอื่นที่ไม่ใช่ยุง รวมทั้งสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์มีกระดูกสันหลัง⁽⁴⁾

เนื่องจากผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์กำจัดแมลงที่จำหน่ายในประเทศไทยมีราคาแพง และหาซื้อได้ยาก ดังนั้นการคิดค้นวิธีการผลิตชีวภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงจากจุลินทรีย์ที่ใช้ต้นทุนน้อยและมีขั้นตอนการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก สามารถทำได้ในระดับครัวเรือนจึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อนำไปสู่การลดประชากรยุงรำคาญเพื่อเป็นการ

ป้องกันการเกิดโรคติดต่อที่นำโดยยุงพาหะ รวมทั้งยังช่วยให้ประชาชนลดค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมีกำจัดแมลง ตลอดจนลดอันตรายจากผลข้างเคียงของสารเคมีเหล่านี้ด้วย การศึกษาครั้งนี้จึงได้คัดค้นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากสิ่งเหลือทิ้งในครัวเรือน และมีขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ไม่ยุ่งยากแต่มีประสิทธิภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ดี ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือกน้ำมะพร้าวแก่ เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กำจัดลูกน้ำยุงจากสิ่งเหลือทิ้งในครัวเรือน ผู้วิจัยได้คัดเลือกน้ำมะพร้าวแก่ กากถั่วเหลืองจากการทำนํ้านมถั่วเหลือง และน้ำข้าวข้าว มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์กำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ โดยจากรายงานพบว่าน้ำมะพร้าวแก่มีส่วนประกอบหลักคือ น้ำตาลชนิดละลายน้ำได้ (soluble sugar) โปรตีน กลีโคแลร์ และวิตามิน⁽⁵⁾ นอกจากนี้ยังมีสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์⁽⁶⁾ ที่ผ่านมาพบว่ามีนักวิจัยหลายท่านได้นำน้ำมะพร้าวแก่ไปใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กำจัดลูกน้ำ เช่น *Bacillus thuringiensis israelensis*⁽⁷⁻⁸⁾, *L. sphaericus*⁽⁹⁾ และ *Escherichia coli*⁽¹⁰⁾ ส่วนกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการทำนํ้านมถั่วเหลืองประกอบด้วยโปรตีนสูงถึง ร้อยละ 25 ไขมัน ร้อยละ 10 และยังมีเส้นใย วิตามินและแร่ธาตุต่างๆ⁽¹¹⁾ กากถั่วเหลืองมีสารอาหารที่มีประโยชน์จึงใช้เป็น substrate สำหรับการหมักเชื้อชนิดต่างๆ ได้ดี เช่น *Bacillus subtilis*⁽¹²⁾, *B. natto*⁽¹³⁾ และสำหรับน้ำข้าวข้าว มีส่วนประกอบหลักคือคาร์โบไฮเดรต และมีวิตามินหลายชนิด ได้แก่ บี1 บี2 และบี3⁽¹⁴⁾ นักวิจัยของประเทศเวียดนามนำน้ำข้าวข้าวมาใช้ในการเพาะเลี้ยง *Streptococcus thermophilus* เพื่อผลิต Hyaluronic acid⁽¹⁵⁾ พบว่าได้ผลดี ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารจากวัตถุดิบเหลือทิ้งที่สามารถใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *L. sphaericus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมไปถึงการศึกษาระยะเวลาในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ ทั้งภายนอกและภายในห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lysinibacillus sphaericus* ด้วยอาหารที่ได้จากสิ่งเหลือทิ้ง

สายพันธุ์แบคทีเรีย

เชื้อ *L. sphaericus* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ท้องถิ่นจากจังหวัดพระนครศรีอยุธยา⁽¹⁶⁾ ที่ค้นพบโดยฝ่ายวิจัยและทดสอบแมลงทางชีววิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับการทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ รวมทั้งได้ผ่านการทดสอบด้วยวิธี Subchronic toxicity test จากห้องปฏิบัติการพิษวิทยา สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ว่ามีความปลอดภัยต่อสัตว์ทดลอง⁽¹⁷⁾

การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อ *L. sphaericus* ด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth นำไปแช่ในห้องหมักหมย (23-28 °C) ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดความขุ่นให้มีค่า OD₆₀₀ = 1 ด้วยเครื่อง

สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Thermo Scientific) เพื่อให้ได้เชื้อที่อยู่ในช่วง log phase สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารชนิดอื่นเพื่อให้มีการสร้างสปอร์และผลิตโปรตีนที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุง (toxin protein)

สิ่งเหลือทิ้งที่ใช้ทำอาหารเลี้ยงเชื้อ

สิ่งเหลือทิ้งที่ใช้มี 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมะพร้าวแก่ กากถั่วเหลือง และน้ำข้าวข้าว โดยทำการเตรียมจำนวน 9 สูตร ประกอบด้วยสูตรปกติที่ไม่มีการเติมน้ำตาลทราย และสูตรที่แปรผันปริมาณน้ำตาลทราย ดังนี้

1. น้ำมะพร้าวแก่ จำนวน 3 สูตร

- 1) น้ำมะพร้าวแก่ ไม่เติมน้ำตาลทราย
- 2) น้ำมะพร้าวแก่ เติมน้ำตาลทราย ร้อยละ 2.5
- 3) น้ำมะพร้าวแก่ เติมน้ำตาลทราย ร้อยละ 5

2. นํ้ากากถั่วเหลือง โดยนํ้ากากถั่วเหลืองหนัก 50 กรัมผสมนํ้า ปริมาตร 1 ลิตร นำไปทำนํ้านมถั่วเหลืองนํ้ากากที่ได้หนัก 10 กรัม มาเติมนํ้า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ได้เป็นนํ้ากากถั่วเหลือง จำนวน 3 สูตร

- 1) นํ้ากากถั่วเหลือง ไม่เติมนํ้าตาลทราย
- 2) นํ้ากากถั่วเหลือง เติมนํ้าตาลทราย ร้อยละ 2.5
- 3) นํ้ากากถั่วเหลือง เติมนํ้าตาลทราย ร้อยละ 5

3. น้ำข้าวข้าว ที่ข้าวจากข้าว 500 กรัมต่อลิตร จำนวน 3 สูตร

- 1) น้ำข้าวข้าว ไม่เติมน้ำตาลทราย
- 2) น้ำข้าวข้าว เติมน้ำตาลทราย ร้อยละ 2.5
- 3) น้ำข้าวข้าว เติมน้ำตาลทราย ร้อยละ 5

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. sphaericus* ในอาหารจากสิ่งเหลือทิ้ง

นำหัวเชื้อ *L. sphaericus* ที่มีค่า OD₆₀₀ = 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงแต่ละสูตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิห้อง (23-28 °C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *L. sphaericus* ในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ

ลูกน้ำยุงรำคาญ

ลูกน้ำยุงรำคาญที่ใช้ในการทดสอบคือ *Culex quinquefasciatus* ได้รับจากห้องเลี้ยงแมลง กลุ่มงานกีฏวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (NIH strain) โดยเป็นลูกน้ำวัย 4 ตอนต้น (early fourth instar larvae) ที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง เคลื่อนที่ได้คล่องแคล่วว่องไว มีอายุประมาณ 4-6 วัน ลำตัวยาวประมาณ 4-5 มิลลิเมตร

การทดสอบประสิทธิภาพเพื่อหาค่า LC₅₀

การประเมินประสิทธิภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำตายร้อยละ 50 (median lethal concentration: LC₅₀) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ หากค่า LC₅₀ ต่ำแสดงว่าจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้สูง เริ่มต้นด้วยการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย ดำเนินการโดยนำอาหารเหลวที่มีเชื้อ *L. sphaericus* มาเจือจางด้วยน้ำกรองครั้งละ 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.1 – 1,000 ppm ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อถ้วยทดสอบ เตรียมความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ และเตรียมชุดควบคุมที่เป็นน้ำกรองอีก 2 ซ้ำ นำลูกน้ำยุงรำคาญ ระยะที่ 4 ตอนต้น ใส่ในถ้วยทดสอบๆ ละ 10 ตัว จากนั้นอ่านผลการตายของลูกน้ำยุงรำคาญหลังการทดสอบ 48 ชั่วโมง โดยนับจำนวนลูกน้ำเป็นที่ยังแข็งแรงและมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อการเคาะถ้วยทดสอบและว่ายน้ำตามปกติเมื่อถูกสัมผัสด้วยปลายไม้ แล้วคำนวณอัตราตายของลูกน้ำยุงรำคาญ

จากนั้นเลือกช่วงความเข้มข้นที่ได้จากการทดสอบเบื้องต้นที่มีลูกน้ำตายร้อยละ 1-99 มาใช้ในการทดสอบแบบละเอียด โดยนำอาหารเหลวที่มีเชื้อ *L. sphaericus* มาเจือจางครั้งละ 2 เท่า ให้ได้ความเข้มข้น 4 - 6 ระดับ ทดสอบความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ และชุดควบคุมอีก 4 ซ้ำ โดยใช้ปริมาณสารผสมถ้วยละ 100 มิลลิลิตร ใส่ลูกน้ำยุงรำคาญในถ้วยทดสอบๆ ละ 10 ตัว แล้วอ่านผลการตายของลูกน้ำยุงรำคาญหลังการทดสอบ 48 ชั่วโมง ตามวิธีที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น จากนั้นคำนวณหาค่าความ LC₅₀ โดยใช้โปรแกรม Probit analysis⁽¹⁸⁾ หลังจากนั้นคัดเลือกสูตรอาหารจากแต่ละวัตถุดิบที่เพาะเลี้ยงได้เชื้อ *L. sphaericus* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญเพื่อนำไปศึกษาความคงตัวของประสิทธิภาพในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน

การควบคุมคุณภาพและการหาค่าทางสถิติ

1. กำหนดให้อุณหภูมิห้องทดสอบอยู่ที่ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$
2. น้ำสะอาดที่ใช้ทดสอบมีค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง 6.8-7.2
3. ดำเนินการทดสอบซ้ำ 4 ครั้ง แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยของ LC₅₀ ค่า 95% confidence interval (95% CI) และค่า standard error (SE)
4. ควบคุมคุณภาพการทดสอบโดยกำหนดให้ค่า correlation coefficient (R) ไม่ต่ำกว่า 0.96
5. กรณีที่พบลูกน้ำตายในชุดควบคุมร้อยละ 5-20 ให้ปรับค่าอัตราตายแท้จริงด้วย Abbott's formula⁽¹⁹⁾

3. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *L. sphaericus* ที่เก็บรักษาในและนอกห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อ *L. sphaericus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ (ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเก็บรักษาในห้องปฏิบัติการซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง $23 - 28^{\circ}\text{C}$ และกลุ่มที่ 2 เก็บรักษานอกห้องปฏิบัติการซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง $25 - 35^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 12 เดือน โดยเก็บตัวอย่างนำมาทดสอบ

ประสิทธิภาพทุก 4 เดือน ด้วยวิธีการทดสอบประสิทธิภาพเพื่อหาค่า LC_{50} ที่ระบุไว้ในข้อ 2 เพื่อศึกษาความคงตัวของประสิทธิภาพในระยะเวลาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ผู้วิจัยได้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Probit analysis สำหรับหาค่า LC_{50} และโปรแกรม R ในการเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารที่เก็บรักษาในและนอกห้องปฏิบัติการ ใช้ค่า LC_{50} เป็นตัวชี้วัดประสิทธิภาพวิเคราะห์ผลด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way ANOVA) เพื่อหาความแตกต่างระหว่างสูตรอาหารและอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 จากนั้นดำเนินการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. sphaericus* ด้วยอาหารที่ได้จากสิ่งเหลือทิ้งและการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. sphaericus* ในอาหารจากสิ่งเหลือทิ้งทั้ง 3 ชนิด รวม 9 สูตร และทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ในระดับห้องปฏิบัติการจากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) พบว่า มีสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. sphaericus* ด้วยอาหารที่ได้จากสิ่งเหลือทิ้งอย่างน้อย 2 สูตร ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ในระดับห้องปฏิบัติการแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 ($F = 5.81$ และ $p = .021$) และได้ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสูตรอาหารแต่ละสูตร ได้ผลดังตารางที่

1

ตารางที่ 1 LC_{50} ของ *L. sphaericus* ในอาหารทั้งหมด 9 สูตร

ลำดับ	สูตรอาหาร	pH	$LC_{50} \pm SE. (ppm)$
สูตรน้ำมะพร้าวแก่			
1	น้ำมะพร้าวแก่ ไม่เติมน้ำตาลทราย	5.40	$1.24 \pm 0.07b$
2	น้ำมะพร้าวแก่ เติมน้ำตาลทราย ร้อยละ 2.5	5.43	$1.22 \pm 0.01b$
3	น้ำมะพร้าวแก่ เติมน้ำตาลทราย ร้อยละ 5	5.42	$0.96 \pm 0.09b$
สูตรน้ำกากถั่วเหลือง			
4	น้ำกากถั่วเหลือง ไม่เติมน้ำตาลทราย	6.95	$0.42 \pm 0.03a$
5	น้ำกากถั่วเหลือง เติมน้ำตาลทราย ร้อยละ 2.5	6.93	$0.46 \pm 0.02a$
6	น้ำกากถั่วเหลือง เติมน้ำตาลทราย ร้อยละ 5	6.97	$0.51 \pm 0.01a$
สูตรน้ำข้าวข้าว			
7	น้ำข้าวข้าว ไม่เติมน้ำตาลทราย	6.32	$25.04 \pm 1.58d$
8	น้ำข้าวข้าว เติมน้ำตาลทราย ร้อยละ 2.5	6.29	$8.21 \pm 0.14c$
9	น้ำข้าวข้าว เติมน้ำตาลทราย ร้อยละ 5	6.27	$44.31 \pm 0.18d$
Control	Nutrient broth	6.97	$0.55 \pm 0.02a$

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ Duncan's New Multiple Range test

จากข้อมูลในตารางที่ 1 พบว่าอาหารจากน้ำกากถั่วเหลืองเหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยง *L. sphaericus* มากที่สุด ไม่แตกต่างกับการใช้ Nutrient broth ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำมะพร้าวแก่ ส่วนน้ำข้าวข้าวมีความเหมาะสมน้อยที่สุด ซึ่งจากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า เมแทบอลิซึมของ *L. sphaericus* นั้น ไม่สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตได้ เนื่องจากขาดเอนไซม์ ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส (phospho-glucose isomerase : EC 5.3.1.9) โดยแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียชนิดนี้มักจะประกอบด้วย อะซิเตท (acetate) หรือกลีเซอรอล (glycerol) แทนกลูโคส (glucose) นอกจากนี้ สารประกอบไนโตรเจน เช่น เอทานอลามีน (ethanolamine) ทรีโอนีน (threonine) และ ไกลซีน (glycine) ก็สามารถถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนทางเลือกสำหรับ *L. sphaericus* ได้เช่นกัน⁽²⁰⁾ ซึ่งเป็นไปตามผลการวิจัยที่พบว่า การเติมน้ำตาลทรายไม่ได้ทำให้ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดเพิ่มขึ้น

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีกรดอะมิโนหลายชนิดที่มีส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโต การสร้างสปอร์และการผลิตสารพิษ ของ *L. sphaericus* และเนื่องจากขาดเอนไซม์บางชนิดทำให้แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นบางส่วนได้ เช่น L-leucine, L-isoleucine, L-valine,

L-phenylalanine และ L-tyrosine⁽²¹⁾ ทำให้สันนิษฐานได้ว่า กากถั่วเหลืองซึ่งมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก และมีกรดอะมิโนหลายชนิด เช่น phenylalanine, methionine, threonine, valine, isoleucine, leucine, tryptophan และ lysine⁽²²⁾ จึงสามารถให้สารอาหารที่ครบถ้วนและเพียงพอต่อการเจริญเติบโต รวมไปถึงการสร้างสปอร์และการผลิตสารพิษ ของ *L. sphaericus* ได้มากกว่า น้ำมะพร้าวแก่ และน้ำข้าวข้าว ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรต

นอกจากสารอาหารแล้ว พบว่าค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษของ *L. Sphaericus* โดยช่วง pH ที่แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ pH 7 – 8⁽²³⁾ และสร้างสารพิษได้มากที่สุดที่ pH 7⁽²⁴⁾ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรน้ำกากถั่วเหลืองมีค่า pH ใกล้เคียง 7 มากที่สุด จึงมีประสิทธิภาพดีที่สุด แต่น้ำมะพร้าวแก่ที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 5.40 – 5.42 กลับมีประสิทธิภาพมากกว่าน้ำข้าวข้าวที่มี pH อยู่ในช่วง 6.27 – 6.32 น่าจะเป็นผลมาจากสารอาหารและองค์ประกอบอื่นๆ ของน้ำมะพร้าวแก่ที่มีความเหมาะสมมากกว่า

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *L. sphaericus* ในอาหารสูตรต่างๆ ที่เก็บรักษาในและนอกห้องปฏิบัติการ

คัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดของวัตถุดิบแต่ละชนิดซึ่งได้แก่ น้ำกากถั่วเหลืองที่ไม่เติมน้ำตาลทราย น้ำมะพร้าวแก่ที่เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 5 และน้ำข้าวข้าวที่เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 2.5 มาติดตามประสิทธิภาพเมื่อเก็บรักษาในและนอกห้องปฏิบัติการทุกสี่เดือน เป็นระยะเวลา 12 เดือน โดยอุณหภูมิในห้องปฏิบัติการเท่ากับ 23-28 °C และอุณหภูมิสำหรับเก็บนอกห้องปฏิบัติการเท่ากับ 25 - 35 °C จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว พบว่า มีสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. sphaericus* ที่เก็บรักษาในและนอกห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 2 สูตร ทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อ *L. sphaericus* ในอาหารสูตรต่าง ๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 ($F = 14.57$ และ $p = .02$) และได้ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสูตรอาหารแต่ละสูตร ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 LC_{50} ของ *L. sphaericus* ในอาหารแต่ละสูตรที่เก็บภายในห้อง (23 - 28 °C) และภายนอกห้อง (25 - 35 °C) เป็นระยะเวลา 12 เดือน

สูตรอาหาร	$LC_{50} \pm SE. (ppm)$						
	เริ่มต้น	4 เดือน		8 เดือน		12 เดือน	
		ในห้อง	นอกห้อง	ในห้อง	นอกห้อง	ในห้อง	นอกห้อง
Nutrient broth (Control)	0.16±0.01a	0.29±0.04a	0.87±0.11b	0.57±0.14b	3.42±0.15b	4.74±0.35b	> 100b
น้ำกากถั่วเหลืองไม่เติมน้ำตาลทราย	0.10±0.01a	0.25±0.01a	0.27±0.04a	0.33±0.03a	0.43±0.03a	1.18±0.14a	1.92±0.15a
น้ำมะพร้าวแกล้น้ำตาลทราย	0.28±0.02a	0.34±0.08a	1.70±0.23c	0.89±0.12c	12.37±1.48c	23.97±0.97c	> 100b
นมผงถั่วเหลือง	0.6b						
5							
น้ำข้าวข้าว	2.74±0.17b	8.22±2.17b	25.76±0.65d	40.98±6.74d	> 100d	52.31±0.44d	> 100b
นมผงถั่วเหลือง	0.6c						
2.5							

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบด้วย Duncan's New Multiple Range test

จากตารางที่ 2 เมื่อเก็บอาหารแต่ละสูตรในห้อง (23 - 28 °C) และนอกห้อง (25 - 35 °C) เป็นเวลา 12 เดือน พบว่าเชื้อ *L. sphaericus* ในอาหารแต่ละสูตรมีประสิทธิภาพการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญลดลงเรื่อยๆ โดยการเก็บอาหารในห้องทำให้ประสิทธิภาพลดลงน้อยกว่าการเก็บนอกห้องซึ่งมีอุณหภูมิสูงกว่า ดังนั้นอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อการลดประสิทธิภาพของเชื้อ *L. sphaericus* เมื่อพิจารณาการนำเชื้อ *L. sphaericus* ในอาหารแต่ละสูตรไปใช้งาน โดยวัดจากค่า LC_{50} ที่ไม่เกิน 100 ppm พบว่าอาหารทุกสูตรที่เก็บภายในห้องเป็นเวลา 12 เดือน ยังคงมีค่า LC_{50} ต่ำกว่า 100 ppm แสดงว่าเชื้อ *L. sphaericus* ในอาหารเหล่านี้สามารถนำไปใช้กำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ แต่ต้องเพิ่มปริมาณการใช้ให้มากขึ้นโดยเฉพาะน้ำมะพร้าวแกล้น้ำตาลทรายร้อยละ 5 และน้ำข้าวข้าวเติมน้ำตาลทรายร้อยละ 2.5 เนื่องจากมีประสิทธิภาพลดลงมาก ส่วนเชื้อ *L. sphaericus* ในอาหารที่เก็บภายนอกห้อง พบว่าอาหารทุกสูตรยกเว้นน้ำกากถั่วเหลืองไม่เติมน้ำตาล

ทรายเก็บได้เพียง 4-8 เดือน หากเก็บนานกว่านี้จะไม่สามารถนำไปใช้กำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ โดยน้ำขาวข้าวเติมน้ำตาลทรายร้อยละ 2.5 มีประสิทธิภาพลดลงเร็วที่สุด (เก็บได้เพียง 4 เดือน) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญของเชื้อ *L. sphaericus* ในอาหารทั้ง 4 สูตร (รวม control) หลังจากเก็บเป็นเวลา 12 เดือน พบว่าน้ำกากถั่วเหลือง

ไม่เติมน้ำตาลทรายมีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมาคือ Nutrient broth, น้ำมะพร้าวแก่เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 5 และน้ำขาวข้าวเติมน้ำตาลทรายร้อยละ 2.5 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าน้ำกากถั่วเหลืองไม่เติมน้ำตาลทรายมีความคงตัวดีที่สุด สามารถเก็บได้นานถึง 12 เดือน ทั้งในและนอกห้อง (LC_{50} เท่ากับ 1.18 และ 1.92 ppm ตามลำดับ) โดยที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ดี

ทั้งนี้ในภาพรวมพบว่าเชื้อ *L. sphaericus* ในอาหารแต่ละสูตรมีความคงตัวแตกต่างกันในช่วงอุณหภูมิที่ต่างกัน และมีประสิทธิภาพลดลงตามระยะการเก็บทั้งในห้องและนอกห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ อาหารที่เก็บรักษามีองค์ประกอบของสารอาหารที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม หรือมีความเป็นกรด-ด่าง (pH) เปลี่ยนไป เชลล์จุลินทรีย์จึงไม่สามารถสร้างสารพิษได้เหมือนเดิม อย่างเช่นน้ำมะพร้าวแก่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ น้ำตาล sucrose glucose fructose⁽²¹⁾ เมื่อเก็บเป็นเวลานานขึ้น น้ำตาลจะเกิดขบวนการหมักจนอาหารมีสภาพเป็นกรด ทำให้ pH ของน้ำมะพร้าวต่ำลงจนทำลายเซลล์ หรือทำให้เซลล์มีประสิทธิภาพต่ำลง หรืออาจจะเกิดจากการที่เชลล์จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเต็มที่จนเข้าสู่ช่วง decline phase ทำให้เซลล์บางส่วนตายจึงไม่มีการผลิตสารพิษ (toxin protein) เพิ่ม หรืออาจเป็นเพราะอาหารถูกปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากอาหารเหล่านี้ไม่ได้รับการนึ่งทำลายเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันสูง บางสูตรอาหาร เช่น น้ำมะพร้าวแก่ และน้ำขาวข้าว นำวัตถุดิบมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อโดยไม่ผ่านความร้อน ส่วนน้ำกากถั่วเหลืองได้จากน้ำนมถั่วเหลืองที่มีการต้มให้เดือดก่อนแยกกากออกมา จึงมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นน้อยกว่า

สรุปผลการวิจัย

น้ำกากถั่วเหลืองสามารถใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. sphaericus* ที่มีต้นทุนต่ำ ทำให้ได้เชลล์ *L. sphaericus* ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ดี และยังเป็นการนำสิ่งเหลือทิ้งจากการทำน้ำนมถั่วเหลืองมาใช้ให้เกิดประโยชน์ เมื่อเก็บรักษาเชื้อ *L. sphaericus* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกากถั่วเหลืองในห้องและนอกห้องปฏิบัติการในช่วงอุณหภูมิ 23 - 35 °C เป็นระยะเวลา 12 เดือน พบว่าเชื้อมีประสิทธิภาพลดลงเพียงเล็กน้อย ยังคงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญได้ดี การศึกษาวิจัยในระยะต่อไปควรนำเชื้อ *L. sphaericus* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกากถั่วเหลืองไปทดสอบในแหล่งเพาะพันธุ์จริงภาคสนามเพื่อยืนยันถึงการนำไปใช้ควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญได้จริง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันโรคติดต่อต่างๆ ที่นำโดยยุงรำคาญและช่วยลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลงที่มีอันตรายต่อสุขภาพของประชาชนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Singh PK. Elimination of infectious diseases from the South-East Asia Region: keeping the promise. Singapore: Springer; 2021.
2. Sudjaritruk T, Kaewpoowat Q, Prasarakkee C, Sarachai S, Taurel AF, Sricharoen, et al. Seroepidemiological study of Japanese encephalitis virus in Chiang Mai: Immunity and susceptibility 28 years after introduction of a vaccination programme. PLOS Negl Trop Dis. 2022;16(8):e0010674.
3. Gan SJ, Leong YQ, bin Barhanuddin MFH, Wong ST, Wong SF, Mak JW, et al. Dengue fever and insecticide resistance in *Aedes* mosquitoes in Southeast Asia: a review. Parasites & Vectors. 2021;14(1):315.
4. Lacey LA. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. Journal of the American Mosquito Control Association. 2007;23(sp2): 133-63, 31.
5. Prades A, Dornier M, Diop N, Pain J. Coconut water uses, composition and properties: A review. Fruits. 2012;67(2):87-107.
6. Osazuwa OE, Ahonkhai I. Coconut water as growth medium for micro-organisms. Niger J Palms Oil Seeds. 1989;10(11):91-5.
7. Chilcott CN, Pillai JS. The use of coconut wastes for the production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. World J Microbiol Biotechnol. 1985;1:327-32.
8. Prabakaran G, Hoti SL, Manonmani AM, Balaraman K. Coconut water as a cheap source for the production of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, a mosquito control agent. Acta Trop. 2008;105(1):35-8.
9. Yadav K, Dhiman S, Baruah I, Singh L. Development of cost effective medium for production of *Bacillus sphaericus* strain isolated from Assam, India. Microbiol J. 2011;1:65-70.
10. Sekar N, Veetil SK, Neerathilingam M. Tender coconut water an economical growth medium for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. BMC Biotechnol. 2013; 13:70.
11. อัญชลี อุษณาสวรรณกุล, กัญญ์วรา ทองกระจ่าง. การใช้ประโยชน์จากกากถั่วเหลือง. วารสารวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. 2565;52(1):24-36.
12. Akiihiro O, Takashi A, Makoto S. Use of soybean curd residue, Okara, for the solid state substrate in the production of lipopeptide antibiotic, Iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22. Process biochem. 1996;31(8):801-6.

13. Yokata T, Hottori T, Ohishi H, Ohami H, Watanabe K. Effect of oral administration of crude antioxidant preparation from fermented products of Okara (Bean Curd Residue) on experimentally induced inflammation. *LWT - Food Sci. Technol.* 1996;29(4):304-9.
14. Marto J, Neves Â, Gonçalves LM, Pinto P, Almeida C, Simões S. Rice Water: A traditional ingredient with anti-aging efficacy. *Cosmetics.* 2018;5(2):26.
15. Tu NHK, Trang PTT. Effects of rice-washing water on the hyaluronic acid production of *Streptococcus thermophilus*. In: Toi V, Toan N, Dang KT, Lien PT, editors. 4th International Conference on Biomedical Engineering in Vietnam 2012: IFMBE Proceedings; 2012 Jan 8-12; Ho Chi Minh, Vietnam. Berlin: Springer; 2013. p. 168-70.
16. เลาจนา เชาวนาดิษฐ์, สุวิทย์ ชนศรีภักดีกุล, ศิริพรรณ วงศ์วานิช, สุนันทา รามศิริ. แบคทีเรียจากจังหวัดพระนครศรีอยุธยาที่มีประสิทธิภาพฆ่าลูกน้ำยุง. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.* 2538;37(3):187-95.
17. ทรงพล ชีวะพัฒน์, ปราณี ขวลิตรำรง, สมเกียรติ ปัญญาเมือง, สดุดี รัตนจรัสโรจน์, เลาจนา เชาวนาดิษฐ์. พิษกึ่งเรื้อรังของแบคทีเรียก่อโรคในแมลง แบซิลลัส สเฟียริกัส เอช-5 สายพันธุ์อยุธยา. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.* 2542;41(3):305-13.
18. Finney DJ. Probit analysis. Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
19. Abbott WSA. Method of computing effectiveness of insecticide. *J Econ Entomol.* 1925;18:265-7.
20. Hu X, Fan W, Han B, Liu H, Zheng D, Li Q, et al. Complete genome sequence of the mosquitocidal bacterium *Bacillus sphaericus* C3-41 and comparison with those of closely related *Bacillus* species. *J Bacteriol.* 2008;190(8):2892-902.
21. Gómez-Garzón C, Hernández-Santana A, Dussán J. A genome-scale metabolic reconstruction of *Lysinibacillus sphaericus* unveils unexploited biotechnological potentials. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179666
22. Kudeřka W, Kowalska M, Popis M. Quality of Soybean Products in Terms of Essential Amino Acids Composition. *Molecules.* 2021;26(16):5071.
23. Wang J, Jonkers HM, Boon N, De Belie N. *Bacillus sphaericus* LMG 22257 is physiologically suitable for self-healing concrete. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(12):5101-14.
24. El-Bendary MA, Moharam ME, Foda MS. Efficient mosquitocidal toxin production by *Bacillus sphaericus* using cheese whey permeate under both submerged and solid-state fermentations. *J Invertebr Pathol.* 2008;98(1):46-53.