โครงสร้างและการประยุกต์ใช้โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิดไบนารี่จากแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus*

Mosquito Larvicidal Binary Toxin from *Lysinibacillus sphaericus*: Structure and Application

กนกพร ศรีสุจริตพานิช*

Kanokporn Srisucharitpanit*

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Faculty of Allied Health Science, Burapha University

Received : 24 August 2018

Accepted : 9 November 2018

Published online : 21 November 2018

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* เดิมเรียกว่า *Bacillus sphaericus* มีความสามารถในการฆ่าตัวอ่อนของยุงโดยผลิตโปรตีนสารพิษชนิดไบนารี่ (Binary toxin) ในระยะที่มีการสร้างสปอร์ โปรตีนไบนารี่ออกฤทธิ์ต่อระยะตัวอ่อนของยุงรำคาญและยุงก้นปล่องได้ดี โปรตีนไบนารี่ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดที่ทำงานร่วมกัน ได้แก่ โปรตีนบินเอ (BinA) และโปรตีนบินบี (BinB) โครงสร้างของโปรตีนชนิดสองชนิดนี้มีความคล้ายคลึงกันแต่มีหน้าที่ต่างกัน เมื่อลูกน้ำยุงกินโปรตีนไบนารี่เข้าไปจะเกิดการกระตุ้นโดยเอนไซม์ในกระเพาะ แล้วเข้าสู่เซลล์ในกระเพาะลูกน้ำเกิดการออกฤทธิ์ส่งผลให้ลูกน้ำเป็นอัมพาตและตายในที่สุด ปัจจุบันนี้ได้มีการนำแบคทีเรียชนิดนี้มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการควบคุมยุงพาหะแทนการใช้สารเคมีได้ผลในหลายประเทศและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่การใช้งานยังไม่แพร่หลายมากนัก เนื่องจากออกฤทธิ์ช้าและยังขาดข้อมูลด้านการทำงาน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการทบทวนนี้คือการสรุปประเด็นที่สำคัญของ *L. sphaericus* โดยเฉพาะในด้านโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิดไบนารี่ เพื่อการศึกษาในอนาคตจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมแมลงศัตรูพืชและพาหะนำโรคที่มีศักยภาพสูงมากขึ้นและมีการใช้งานอย่างแพร่หลาย

คำสำคัญ : *Lysinibacillus sphaericus*, โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิดไบนารี่, ลูกน้ำยุง

***Corresponding author. E-mail** : kanokporns@go.buu.ac.th

Abstract

Binary toxin (Bin) is produced by *Lysinibacillus sphaericus* during sporulation phase. The former name is *Bacillus sphaericus*. The binary toxin is highly toxic to *Culex* and *Anopheles* mosquito larvae. The binary toxin is composed of two proteins, BinA and BinB. The structures of both proteins are similar but they perform different function. After ingestion by larvae, the binary toxin is solubilized under alkaline condition and digested by protease in the larval gut resulting in paralysis and death. To date, *L. sphaericus* is used as a biological control agent instead of chemical insecticides as it is more environmental friendly. Nevertheless, the use of *L. sphaericus* is not widespread. This review aims to summarize the crucial knowledge of the toxin produced by *L. sphaericus,* especially in the structure and function of the mosquito larvicide binary toxin. In order to develop a binary toxin with higher efficacy, the basic knowledge must be applied.

Keywords: *Lysinibacillus sphaericus*, mosquito larvicidal binary toxin, mosquito larvicidal

บทนำ

ยุงจัดเป็นแมลงที่อยู่ในสกุล *Diptera* โดยส่วนมากยุงในกลุ่ม Anopheliae และ Culicinae จะเป็นพาหะนำโรค เช่น ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* sp.) เป็นพาหะนำโรคมาลาเรีย ยุงลาย (*Aedes* sp.) เป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออกและชิคุนกุนย่า ยุงรำคาญ (*Culex* sp.) เป็นพาหะนำโรคเท้าช้าง (filariasis) เป็นต้น โรคติดเชื้อเหล่านี้ที่เกิดจากยุงเป็นพาหะนับว่ายังมีอันตรายมากทำให้มีผู้เสียชีวิตปีละหลายล้านคน โดยเฉพาะประเทศในแถบร้อนชื้น มีอัตราการกระจายของโรคติดเชื้อสูงมากเนื่องจากยุงมีการเจริญเติบโตแพร่กระจายได้ดี (Becker N, Petric D, *et al.* 2010) ดังนั้นยุงจึงจัดได้ว่าเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์ (Chapman 1974, Clements and Clements 1992) การควบคุมการแพร่กระจายของโรคทำได้โดยการควบคุมพาหะนำโรค ซึ่งในปัจจุบันนี้มีวิธีต่าง ๆ ที่ถูกพัฒนามาเพื่อกำจัดและควบคุมจำนวนประชากรยุง วิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในหลาย ๆ ประเทศ รวมทั้งประเทศไทยคือ การใช้ยาฆ่าแมลง (insecticide) จากการใช้สารเคมีฆ่าแมลงอย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลานานนับสิบปี ส่งผลให้ประชากรยุงมีการดื้อต่อสารเคมีและพบสารเคมีตกค้างสะสมอยู่ในธรรมชาติซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์อื่น ๆ ดังนั้นเพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมีจึงเกิดแนวความคิดที่จะใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological compounds) มาควบคุมยุงพาหะตั้งแต่ปี ค.ศ. 1964 โดยคณะนักวิทยาศาสตร์ได้มีการค้นพบแบคทีเรียหลายชนิดที่ก่อโรคในตัวอ่อนของยุง ซึ่งสามารถพบแบคทีเรียเหล่านี้ได้ตามแหล่งที่มีประชากรลูกน้ำยุงอาศัยอยู่ ได้แก่ แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* spp. เช่น *Bacillus thuringiensis* และ *Lysinibacillus sphaericus* (Chapman 1974) ต่อมามีการพบว่าสารออกฤทธิ์ที่ทำให้ลูกน้ำยุงตายเป็นโปรตีนสารพิษที่สร้างขึ้นในตัวแบคทีเรียเองจาก *B. thuringiensis* คือ crystal toxin (Cry) และ cytolytic toxin (Cyt) ซึ่งในปัจจุบันมีการค้นพบ Cry และ Cyt toxins หลายชนิดซึ่งมีความสามารถในการออกฤทธิ์ฆ่าตัวอ่อนแมลงได้หลาย ๆ สปีชีส์ต่างกัน และแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุงได้ดี คือ *L. sphaericus* ซึ่งสามารถสร้างโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงที่เรียกว่า binary toxin โดยออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญและลูกน้ำยุงก้นปล่องได้ดี แต่ออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลายในระดับต่ำ (Berry, Hindley *et al.* 1993, Charles and Nielsen-LeRoux 2000) ในปัจจุบันได้มีการนำโปรตีนสารพิษนี้มาใช้งานได้จริง ปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมายและไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม แต่การใช้แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้

ยังมีข้อจำกัดในการใช้งานด้านความคงทนในสิ่งแวดล้อมต่ำทำให้ออกฤทธิ์ได้ในระยะสั้น และเนื่องจากออกฤทธิ์ต่อสปีชีส์ของยุงอย่างจำเพาะทำให้พบการดื้อต่อการใช้โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิดนี้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการทบทวนคือ ต้องการสรุปประเด็นที่สำคัญของ *L. sphaericus* และโปรตีนต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโครงสร้าง หน้าที่และการนำไปใช้ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิดไบนารี่ เพื่อให้ได้ข้อมูลรอบด้านทั้งการทำงานของโปรตีนสารพิษและผลกระทบที่จะเกิดตามมา เช่น การดื้อต่อโปรตีนสารพิษ การออกฤทธิ์ต่อแมลงที่ไม่ใช่เป้าหมาย เป็นต้น ซึ่งจะช่วยให้เกิดการพัฒนาโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงนี้ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นและพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ในเชิงอุตสาหกรรมที่มีการใช้งานกันอย่างแพร่หลายได้

Lysinibacillus sphaericus (Ls)

แบคทีเรีย *L. sphaericus* เดิมเรียกว่า *Bacillus sphaericus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง (rod shape) สามารถสร้างสปอร์ได้ โดยสปอร์ที่สร้างขึ้นจะอยู่ที่ปลายสุดของเซลล์ เรียกว่า terminal spore ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลและดำรงชีวิตโดยอาศัยออกซิเจน (Aerobic bacteria) แบคทีเรีย *L. sphaericus* สามารถพบได้ทั่วไปตามพื้นดินและแหล่งน้ำต่าง ๆ ตามธรรมชาติ ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความหลากหลายทางสายพันธุ์ทำให้ต้องมีวิธีในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น การจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียกลุ่มนี้โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกัน (Phenotypic characteristics) การจำแนกโดยอาศัยหลักความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอ (DNA homology) ซึ่งจะจำแนกออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ DNA homology กลุ่ม I , II , III , IV และ V โดยในกลุ่มที่ II จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่ม IIA และกลุ่ม IIB (Berry 2012) นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกสายพันธุ์ *L. sphaericus* ได้โดยอาศัยความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงที่สูงและต่ำได้ สายพันธุ์ที่มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำสูงจัดอยู่ในกลุ่มย่อย IIA และมี 9 serotype ได้แก่ H1, H2, H3, H5, H6, H9, H25, H26, และ H48 (Han, Liu et al. 2007, Pena-Montenegro, Lozano *et al*. 2015)) *L. sphaericus* สร้างโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงได้ 2 กลุ่ม คือ binary toxin หรือ Bin สร้างขึ้นในระยะที่มีการสร้างสปอร์ และ Mosquitocidal toxin หรือ Mtx สร้างขึ้นในระยะการเจริญเติบโตปกติ และจะถูกสลายไปเมื่อเข้าสู่ระยะการสร้างสปอร์

โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิดไบนารี่ (Binary toxin)

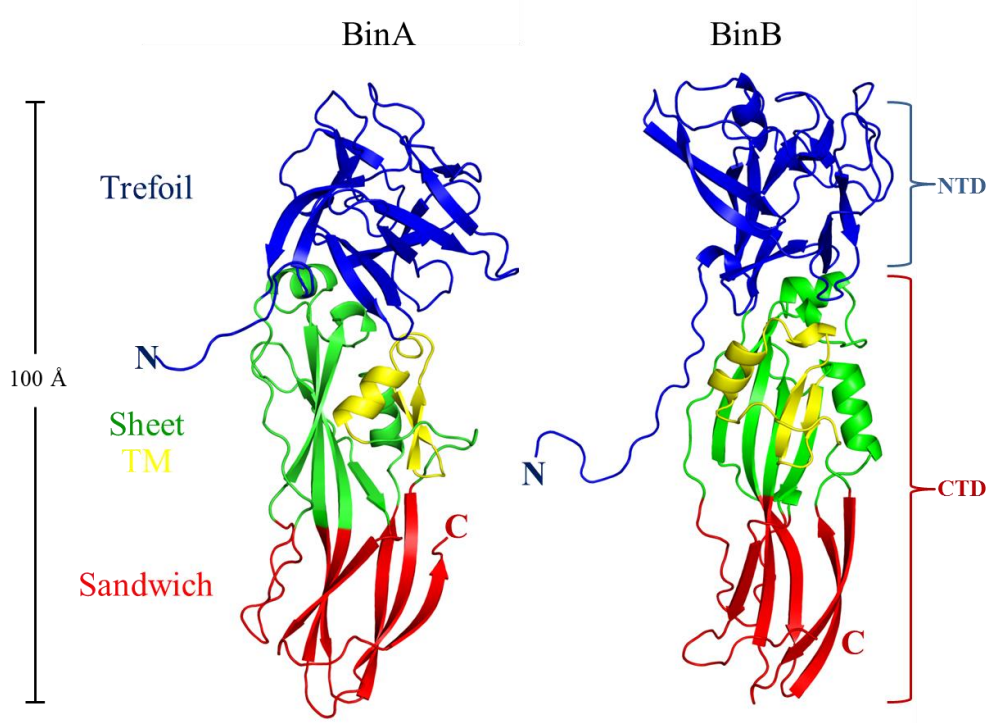
สายพันธุ์ที่มีความเป็นพิษสูงในการฆ่าลูกน้ำยุงของ *L. sphaericus* สามารถสร้างสปอร์พร้อมกับผลึกของโปรตีนสารพิษ ที่เรียกเรียกว่าคลิสตัลท็อกซิน (crystal toxin) หรือ ไบนารี่ท็อกซิน (binary toxin) ซึ่งไบนารี่ท็อกซิน นั้นจะถูกผลิตขึ้นในระยะแรกของการสร้างสปอร์ และการจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่เป็นผลึกจะปรากฏให้เห็นในระยะท้ายของการสร้างสปอร์ ไบนารี่ท็อกซินจะถูกสะสมอยู่บริเวณผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มสปอร์ โดยไบนารี่ท็อกซินประกอบไปด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ โปรตีน BinA และโปรตีน BinB ซึ่งมีขนาด 42 และ 51 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โดยยีนที่เป็นตัวกำหนดโปรตีน BinA และ BinB อยู่บน operon เดียวกันใน chromosomal DNA ทำให้โปรตีนทั้ง 2 ชนิดถูกสร้างขึ้นมาในปริมาณที่เท่ากัน binary toxin นั้นสามารถจำแนกตามลำดับกรดอะมิโนได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ binary toxin types 1, type 2, type 3 และ type 4 ได้จาก สายพันธุ์ IAB59, 2362, 2297 และ LP-1G ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ 2297 และ 2362 เป็นสายพันธุ์ที่ความเป็นพิษสูงและได้รับการศึกษามากที่สุด

โครงสร้างของโปรตีน Binary toxin

การศึกษาโครงสร้างของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงความสำคัญต่อการปรับปรุงคุณภาพการผลิตและการออกฤทธิ์ของโปรตีน ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน BinA และ BinB มีความเหมือนกัน 28 % และคล้ายคลึงกัน 46% (Promdonkoy, Promdonkoy *et al*. 2008) สอดคล้องกับโครงสร้างสามมิติของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ มีความคล้ายคลึงกันแต่มีหน้าที่ต่างกัน โครงสร้างประกอบไปด้วย 2 โดเมน ได้แก่ N-terminal และ C-terminal ดังแสดงในรูปที่ 1 โครงสร้างของทั้งสองโปรตีนนี้ยาวประมาณ 100 Å และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25-30 Å ความแตกต่างของโครงสร้างที่โดดเด่นที่สุดระหว่าง BinA และ BinB ทางฝั่ง N-terminal domain ซึ่งโปรตีน BinB จะมีโครงสร้างเหมือนกัน carbohydrate binding protein ซึ่งอาจมีผลต่อบทบาทของหน้าที่ที่แตกต่างกันของ BinA และ BinB (Srisucharitpanit, Yao *et al*. 2014, Colletier, Sawaya *et al*. 2016) โดย BinB เป็นส่วนที่จับอย่างจำเพาะในกระเพาะลูกน้ำยุง ในขณะที่ BinA มีการจับอย่างไม่จำเพาะ

โปรตีน BinB ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวน 448 ตัว โครงสร้างหลักเป็นสายเบต้า 21 สาย (ß-sheet) และรวมเป็นเกลียวกับสายอัลฟ่า ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 domain หลัก คือ N-terminal domain (NTD) และ C-terminal domain (CTD) โดย NTD เริ่มจากกรดอะมิโน Threonine 19 (Thr19) จนถึง Alanine 200 (Ala200) ที่ประกอบโครงสร้างเป็นรูปทรงกลม มีลักษณะเป็น β-trefoil fold ที่ประกอบไปด้วย 3 motif ได้แก่ Alpha (α) , Beta (β) และ Gamma (γ) ส่วนบริเวณด้านบนจะประกอบไปด้วย พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bridge) ที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโน Cysteine 67 และ Cysteine 161 ซึ่งพันธะไดซัลไฟด์นี้มีหน้าที่ในการรักษาโครงสร้างให้มีความแข็งแรง และยังมีส่วนช่วยให้โปรตีน BinB ทำงานร่วมกับ BinA ในการแสดงความเป็นพิษอีกด้วย CTD มีรูปร่างยาวภายในประกอบไปด้วยกรดอะมิโน Proline 226 (Pro226) – Threonine 407 (Thr407) โดยรวมของโครงสร้างประกอบไปด้วยสาย β ประมาณ 39% ซึ่งหลายสายมีลักษณะยาวและบิดเข้าไปข้างในนอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยกลุ่มของกรดอะมิโนประเภท Aromatic เชื่อมต่ออยู่ระหว่าง β-sheet และ Amphipathic loop รวมทั้งพบกรดอะมิโน serine และ threonine อย่างเด่นชัดบนผิวของ domain ซึ่งลักษณะที่พบดังกล่าวเป็นลักษณะที่พบได้ในโปรตีนสารพิษกลุ่ม Aerolysin ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างรูรั่วชนิดเบต้า (β-Pore forming toxins, β-PFTs) (Srisucharitpanit, Yao *et al*. 2014) และบริเวณ Transmembrane อยู่ตรงกลางของโมเลกุลใน C-terminal domain (CTD) ดังแสดงในภาพที่ 1

โครงสร้างของโปรตีน BinA ค้นพบจากเทคนิค X-ray free-electron laser ในผลึกร่วมกับ BinB โครงสร้างของ BinA ประกอบไปด้วย 2 โดเมน ได้แก่ N-terminal β -trefoil ตั้งแต่ methionine ตำแหน่งที่ 1 ถึง leucine ตำแหน่งที่ 155 และ C-terminal pore-forming domain (PFD) ตำแหน่งที่ 156-370 (Colletier, Sawaya *et al*. 2016) จากโครงสร้างของทั้งสองโปรตีน Colletier และคณะ พบว่าโปรตีนทั้งสองตัวนี้เมื่อถูกกระตุ้นโดยสภาวะด่างและเอนไซม์ในกระเพาะอาหารของยุงจะมีการจัดเรียงโครงสร้างเป็นแบบ 1 ต่อ 1 และร่วมกันทำงานจนนำไปสู่การตายของลูกน้ำยุงในที่สุด จากการเปรียบเทียบโครงสร้างของทั้งสองโปรตีนคาดว่าจะทำให้เกิดรูรั่วคล้ายกับการทำงานของโปรตีน Aerolysin อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลแน่ชัดว่ากลไกการเกิดรูรั่วเป็นแบบ homo หรือ hetero-oligomeric (Colletier *et al*. 2016)



ภาพที่ 1 **โครงสร้างของโปรตีน BinA และ BinB** ประกอบไปด้วย 2 โดเมน ได้แก่ N-terminal domain (NTD) และ C-terminal domain (CTD) โดย CTD แบ่งเป็น 3 ส่วนย่อย คือ β-Sheet (สีเขียว) บริเวณ Transmembrane (สีเหลือง) และ β-sandwich (สีแดง)

กลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีน Binary toxin ในการฆ่าลูกน้ำยุง

โปรตีน BinA และ BinB ที่ถูกสร้างขึ้นใน *L. sphaericus* อยู่ในรูปที่ยังไม่พร้อมทำงานซึ่งมีขนาดประมาณ 42 และ 51 kDa ตามลำดับ จากการทดลองกระตุ้นให้โปรตีนสารพิษอยู่ในรูปที่ทำงานได้ในหลอดทดลองด้วยเอนไซม์จากกระเพาะลูกน้ำยุงพบว่า BinA และ BinB ในสภาพที่พร้อมทำงานจะมีขนาดประมาณ 39 และ 43 kDa ตามลำดับ (Baumann, Baumann *et al.* 1987, Nielsen-Leroux and Charles 1992) หลังจาก BinA และ BinB อยู่ในสภาพที่พร้อมจะทำงานแล้ว BinB จะไปจับกับ receptor แล้วจึงเกิดการ internalize นำ BinA และ/หรือ BinB เข้าสู่ midgut cells โดย receptor-mediated endocytosis (Davidson 1988) และจากศึกษาทางด้าน immunohistochemistry พบว่าทั้ง BinA และ BinB สามารถเข้าสู่ epithelium gut cells ของ *C. quinquefasciatus* ได้ (Silva-Filha and Peixoto 2003) มีหลักฐานชี้ชัดว่า alpha-glucosidase ในกระเพาะลูกน้ำยุงเป็น receptor ของ binary toxin ได้แก่ *Culex pipiens* (Cpm1), *C. quinquefasciatus* (Cqm1) และ *Anopheles gambie* (Agm3) (Artan, 2010) จากนั้นมีการศึกษาโดยการโคลน receptor Cpm1 ใน Madin-Darby Canino Kidney (MDCK) และเติม binary toxin พบว่าสามารถทำให้เซลล์เกิดการ permeability ของ plasma membrane และคาดว่าเกิดจากการสร้างรูรั่ว จากนั้นจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นภายในเซลล์ (Cokmus, Davidson *et al.* 1997, Pauchet, Luton *et al.* 2005, Opota, Gauthier *et al.* 2011) นอกจากนี้ binary toxin ยังสามารถทำให้เกิดรูบน planar lipid bilayer และ large unilamellar phospholipid vesicles (LUVs) โดยไม่ต้องอาศัย receptor (Schwartz, Potvin et al. 2001) การศึกษาต่อมายังพบว่า BinB

มีความสามารถในการแทรกผ่าน lipid membrane แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนทั้ง BinAและ BinB ใน lipid membrane (Boonserm, Moonsom *et al*. 2006, Surya, Chooduang *et al*. 2016) จากเหตุการณ์ทั้งหมดจึงคาดว่า binary toxin น่าจะสร้างรูรั่วบนผิว membrane ได้ แต่ไม่มีหลักฐานปรากฏชัดว่าเกิดรูรั่วทำให้เซลล์แตก จึงเชื่อได้ว่า การเกิดรูรั่วเป็นเพื่อเป็นการนำ toxic subunit หรือ BinA เข้าสู่เซลล์ สอดคล้องกับโครงสร้างของโปรตีน BinA และ BinB ที่คล้ายโปรตีนสร้างรูรั่วกลุ่ม Aerolysin หลังจากนั้นเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงหลายอย่าง เช่น เกิด vacuoles ใน cytoplasm , mitochondria swelling และ เกิดการทำลาย microvilli จนนำไปสู่กระบวนการ apoptosis (Silva-Filha and Peixoto 2003) แต่ยังไม่มีข้อมูลสนับสนุนว่า BinA และ/หรือ BinB เข้าไปทำรบกวนเปลี่ยนแปลงหรือยับยั้งกระบวนการในระดับเซลล์จนนำไปสู่การตายของเซลล์ จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าขั้นตอนการออกฤทธิ์ของ binary toxin เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด เนื่องจากโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันของโปรตีน BinAB กับ aerolysin แสดงให้เห็นว่าอาจสร้างรูรั่วในกลไกที่คล้ายกัน

การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงและการนำไปประยุกต์ใช้

L. sphaericus ถูกพัฒนามาเป็นผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์เพื่อควบคุมยุงพาหะ เช่น GriselESF จาก Labiofam ประเทศคิวบา Sphaerus จาก Bthek Ltda ประเทศบราซิล, VectoLex และ VectoMax® มีส่วนผสมของ *L. sphaericus* กับ *B. thuringiensis* จาก Valent Biosciences Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา จะเห็นได้ว่าการพัฒนาสายพันธุ์ในรูปแบบผสมของ *L. sphaericus* จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพที่ดีขึ้นเนื่องจากมีการเสริมฤทธิ์ระหว่างกัน นอกจากนี้กลไกในการเพิ่มความคงตัวเพื่อป้องกันการดื้อต่อโปรตีนสารพิษที่อาจเกิดขึ้นในแมลงเป้าหมาย มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความสำเร็จในการใช้งานที่ต่อเนื่องของแบคทีเรียชนิดนี้ กลยุทธ์หลักที่ถูกนำมาใช้เพื่อการนี้คือการนำยีนของโปรตีนสารพิษตัวอื่น ๆ ได้แก่ *mtx*, *cry* และ *cyt* ในสายพันธุ์ของ *L. sphaericus* ที่สามารถเสริมฤทธิ์กันได้มาทำงานร่วมกัน ตัวอย่างเช่น เมื่อสังเคราะห์ Mtx1 จาก *L. sphaericus* ซึ่งเป็นโปรตีนที่ออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงเช่นกัน แต่เมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการสร้างสปอร์โปรตีนนี้จะถูกสลายไปโดยเอนไซม์กลุ่ม serine proteinase และ sphericase ต่อมามีความพยายามที่จะลดการถูกทำลายของโปรตีนชนิดนี้เพิ่มให้คงอยู่จนถึงในระยะการสร้างสปอร์โดยคาดหวังว่าจะช่วยเสริมการทำงานของ Binary toxin ที่ถูกสร้างขึ้นในระยะการสร้างสปอร์ยังไม่ประสบความสำเร็จ (Yang, Wang *et al*. 2007) ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากโปรตีน Mtx ยังไม่ข้อจำกัดในด้านความไม่คงตัว ถัดมามีนักวิทยาศาสตร์ค้นพบว่าการกลายพันธุ์แบบสุ่มของ Cry1Aa มีผลต่อการผลิตโปรตีน Cry1Aa ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและเสริมฤทธิ์กับ binary toxin ในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลายได้ (Wirth *et al*.,2000a, b) การแสดงออกของยีน *chiAC* จาก *B. thuringiensis* ใน *L. sphaericus* 2297 โดยใช้โปรโมเตอร์ bin operon ส่งผลให้มีความเป็นพิษมากกว่าสายพันธุ์ 2297 ถึง 4297 เท่า และมีความเป็นพิษต่อทนต่อลูกน้ำยุงรำคาญสายพันธุ์ *C. quinquefasciatus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบว่ามีการดื้อต่อ Binary toxin (Cai, Yan *et al*. 2007) แสดงให้เห็นว่าไคติเนสส่งเสริมทำให้เกิดความเป็นพิษของ Binary toxinได้ ดังนั้นจึงอาจเป็นได้ว่ามีประโยชน์ในการจัดการความต้านทานของลูกน้ำยุงต่อ *L. sphaericus* นอกจากนี้ *L. sphaericus* ยังมีข้อดีของในการใช้ควบคุมยุงพาหะทั่วไปคือ ความคงอยู่ได้ดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งในน่านน้ำที่มีมลพิษซึ่งเป็น แหล่งแพร่พันธุ์ที่ดีสำหรับยุงรำคาญ

บทสรุป

ข้อดีของ *L. sphaericus* ในโปรแกรมควบคุมโดยทั่วไปคือ ความคงอยู่ได้ดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำที่มีมลพิษซึ่งเป็นแหล่งแพร่พันธุ์ที่ดีสำหรับยุงรำคาญ โดยขบวนการพัฒนาเพื่อการผลิตจุลินทรีย์ใช้กำจัดลูกน้ำยุงนั้น มีความยุ่งยากซับซ้อนแต่ผลประโยชน์ที่ได้คือความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมโดย ไม่เกิดการสะสมตกค้างในระยะยาว ซึ่งปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ที่ใช้กำจัดลูกน้ำยุงในหลายรูปแบบทั้งแบบผง ละลายน้ำใส่หรือฉีดพ่นตามแอ่งน้ำเล็ก ๆ และแบบอัดเม็ด อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์เหล่านี้อาจยังไม่เป็นที่นิยมในประเทศไทย เนื่องจากออกฤทธิ์ช้า และด้วยสภาพอากาศที่เหมาะสมต่อการแพร่พันธุ์ของยุง ทำให้อัตราการแพร่กระจายของยุงมีปริมาณมาก การควบคุมยุงพาหะในประเทศไทยจึงต้องอาศัยความร่วมมือในชุมชน การให้ความรู้ความเข้าใจกับวิธีการกำจัด และข้อดีข้อเสียของสารที่ใช้ ดังนั้นชีวภัณฑ์กำจัดยุงจะเป็นนวัตกรรมใหม่ที่ช่วยลดการใช้สารเคมีในประเทศต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Artan, D. (2010) .Role of mosquito alpha-glucosidase in the larvicidal activity of *Bacillus phaericus*. *J Trop Med Pasitol 2010, 33*, 87-92.

Baumann, P., L. Baumann, R. D. Bowditch and A. H. Broadwell (1987). Cloning of the gene for the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* 2362: evidence for a family of related sequences. *J Bacteriol, 169*(9), 4061-4067.

Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Dahl C, Madon M, et al. (2010) .Mosquitoes and their control.2nd ed. Heidelberg: Springer.

Berry, C. (2012). The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. *J Invertebr Pathol, 109*(1), 1-10.

Berry, C., J. Hindley, A. F. Ehrhardt, T. Grounds, I. de Souza and E. W. Davidson (1993). Genetic determinants of host ranges of *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxins. *J Bacteriol*, *175*(2), 510-518.

Boonserm, P., S. Moonsom, C. Boonchoy, B. Promdonkoy, K. Parthasarathy and J. Torres (2006). Association of the components of the binary toxin from *Bacillus sphaericus* in solution and with model lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *342*(4), 1273-1278.

Cai, Y., J. Yan, X. Hu, B. Han and Z. Yuan (2007). Improving the insecticidal activity against resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes by expression of chitinase gene *chiAC* in *Bacillus sphaericus*. *Appl Environ Microbiol, 73*(23), 7744-7746.

Chapman, H. C. (1974). Biological control of mosquito larvae. *Annu Rev Entomol, 19*, 33-59.

Charles, J. F. and C. Nielsen-LeRoux (2000). Mosquitocidal bacterial toxins: diversity, mode of action and resistance phenomena. *Mem Inst Oswaldo Cruz, 95* Suppl 1, 201-206.

Clements, A. N. and A. N. Clements (1992). The biology of mosquitoes. London ; New York Wallingford, Oxfordshire, UK, Chapman & Hall Cambridge, MA CABI.

Cokmus, C., E. W. Davidson and K. Cooper (1997). Electrophysiological effects of *Bacillus sphaericus* binary toxin on cultured mosquito cells. *J Invertebr Pathol ,69*(3), 197-204.

Colletier, J. P., M. R. Sawaya, M. Gingery, J. A. Rodriguez, D. Cascio, A. S. Brewster, T. Michels-Clark, R. H. Hice, N. Coquelle, S. Boutet, G. J. Williams, M. Messerschmidt, D. P. DePonte, R. G. Sierra, H. Laksmono, J. E. Koglin, M. S. Hunter, H. W. Park, M. Uervirojnangkoorn, D. K. Bideshi, A. T. Brunger, B. A. Federici, N. K. Sauter and D. S. Eisenberg (2016). De novo phasing with X-ray laser reveals mosquito larvicide BinAB structure. *Nature*, *539*(7627), 43-47.

Davidson, E. W. (1988). "Binding of the *Bacillus sphaericus* (Eubacteriales: *Bacillaceae*) toxin to midgut cells of mosquito (Diptera: Culicidae) larvae: relationship to host range. *J Med Entomol, 25*(3), 151-157.

Han, B., H. Liu, X. Hu, Y. Cai, D. Zheng and Z. Yuan (2007). "Molecular characterization of a glucokinase with broad hexose specificity from *Bacillus sphaericus* strain C3-41. *Appl Environ Microbiol, 73*(11), 3581-3586.

Nielsen-Leroux, C. and J. F. Charles (1992). "Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *Eur J Biochem, 210*(2), 585-590.

Opota, O., N. C. Gauthier, A. Doye, C. Berry, P. Gounon, E. Lemichez and D. Pauron (2011). *Bacillus sphaericus* binary toxin elicits host cell autophagy as a response to intoxication. *PLoS One, 6*(2), e14682.

Pauchet, Y., F. Luton, C. Castella, J. F. Charles, G. Romey and D. Pauron (2005). Effects of a mosquitocidal toxin on a mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. *Cell Microbiol, 7*(9), 1335-1344.

Pena-Montenegro, T. D., L. Lozano and J. Dussan (2015). Genome sequence and description of the mosquitocidal and heavy metal tolerant strain *Lysinibacillus sphaericus* CBAM5. *Stand Genomic Sci* ,*10,* 2.

Promdonkoy, B., P. Promdonkoy and S. Panyim (2008). High-level expression in Escherichia coli, purification and mosquito-larvicidal activity of the binary toxin from *Bacillus sphaericus*.*Curr Microbiol, 57*(6), 626-630.

Schwartz, J. L., L. Potvin, F. Coux, J. F. Charles, C. Berry, M. J. Humphreys, A. F. Jones, I. Bernhart, M. Dalla Serra and G. Menestrina (2001). Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitocidal binary toxin and its individual components. *J. Membr. Biol., 184*(2), 171-183.

Silva-Filha, M. H. and C. A. Peixoto (2003). Immunocytochemical localization of the *Bacillus sphaericus* binary toxin components in *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae) larvae midgut. *Pesticide Biochem Physiol, 77*, 138-146.

Srisucharitpanit, K., M. Yao, B. Promdonkoy, S. Chimnaronk, I. Tanaka and P. Boonserm (2014). Crystal structure of BinB: a receptor binding component of the binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. *Proteins, 82*(10), 2703-2712.

Surya, W., S. Chooduang, Y. K. Choong, J. Torres and P. Boonserm (2016). Binary Toxin Subunits of *Lysinibacillus sphaericus* Are Monomeric and Form Heterodimers after In Vitro Activation. *PLoS One, 11*(6), e0158356.

Yang, Y., L. Wang, A. Gaviria, Z. Yuan and C. Berry (2007). Proteolytic stability of insecticidal toxins expressed in recombinant bacilli. *Appl Environ Microbiol, 73*(1), 218-225.